

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61L		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/52619 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. November 1998 (26.11.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02753 (22) Internationales Anmeldedatum: 9. Mai 1998 (09.05.98) (30) Prioritätsdaten: 197 21 352.9 22. Mai 1997 (22.05.97) DE 197 55 801.1 16. Dezember 1997 (16.12.97) DE 198 18 098.5 23. April 1998 (23.04.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KESSLER, Horst [DE/DE]; Lichtenbergstrasse 4, D-85748 Garching (DE). FINSINGER, Dirk [DE/DE]; Lichtenbergstrasse 4, D-85748 Garching (DE). JONCZYK, Alfred [DE/DE]; Schepp-Allee 57, D-64295 Darmstadt (DE). MEYER, Jörg [DE/DE]; Schillerstrasse 82, D-63329 Egelsbach (DE). NIES, Berthold [DE/DE]; Bahnhofstrasse 27, D-64407 Fränkisch-Crumbach (DE). KANTLEHNER, Martin [DE/DE]; Plantagenweg 37, D-85354 Freising (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: PEPTIDE-COATED IMPLANTS AND METHODS FOR PRODUCING SAME (54) Bezeichnung: PEPTID-BESCHICHTETE IMPLANTATE UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG (57) Abstract <p>The invention relates to the possibility of biofunctionalizing biomaterials, in particular implants, by covering them with a tailor-made coating of synthesised cell- or tissue-selective RGD peptides which primarily stimulate in vitro the adhesion of cell types intended to ensure the tissue integration of the biomaterial in question.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung beschreibt die Möglichkeit der Biofunktionalisierung von Biomaterialien, insbesondere Implantaten, durch deren maßgeschneiderte Beschichtung mit synthetisierten zell- bzw. geweboselektiven RGD-Peptiden, die in vitro die Adhäsion vorwiegend derjenigen Zell-Spezies stimulieren, die jeweils die Gewebeintegration des entsprechenden Biomaterials vollführen sollen.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Peptid-beschichtete Implantate und Verfahren zu ihrer Herstellung

5 Die Erfindung betrifft Implantate allgemeiner Art für den menschlichen und tierischen Körper, welche mit Peptiden beschichtet sind, die die Adhäsion spezifischer Zellen in der jeweiligen Umgebung des Implantats selektiv zu vermitteln vermögen. Insbesondere betrifft die Erfindung mit RGD-Peptiden beschichtete Implantate und Verfahren zu ihrer Herstellung.

10 Die Erfindung beruht auf dem Prinzip der zielgerichteten Adhäsionsstimulierung ausgewählter Zell-Spezies auf Oberflächenbeschichtungen von Biomaterialien im allgemeinen und Implantaten im speziellen zum Zweck der gewebe selektiven, beschleunigten und verstärkten Integration derselbigen nach operativem Einbringen in
15 das entsprechende Gewebe.

Auf diese Weise können verschiedene Oberflächenteile eines Implantats mit verschiedenen, die Zelladhäsion vermittelnden Peptiden, insbesondere RGD-Peptiden beschichtet und zur Verfügung gestellt werden, die der speziellen Gewebeumgebung, in welcher die Implantate eingebracht werden, Rechnung tragen.
20

Auf diese Weise wird zudem im Hinblick auf "Tissue Engineering" die Generation „intelligenter“ biohybrider Organe durch Selbstorganisation möglich, die die biologische Information zu einer Organregeneration durch gezielte Aktivierung verschiedener Zell-Spezies durch verschiedene Peptide in unterschiedlichen Regionen der Implantatoberfläche tragen.
25

Der Terminus "erfindungsgemäße Peptide" umfaßt im folgenden, wenn nicht speziell anderes oder zusätzliches gesagt wird, alle Peptide, die die Zelladhäsion zu vermitteln vermögen. Hierunter sind vor allem solche gemeint, die die Aminosäuren
30

Arginin (R), Glycin (G) und Asparaginsäure (D) hintereinander enthalten (RGD-Peptide). Beispiele von geeigneten RGD-Peptiden und geeigneten nicht RGD-haltigen Peptiden sind weiter unten aufgeführt. Umfaßt sind ferner entsprechende Peptide, die nicht die RGD-Sequenz enthalten, aber dennoch die Zelladhäsion be-
5 einflussen. Im weitesten Sinne umfaßt die Erfindung auch nicht-peptidische Verbindungen, welche qualitativ die gleiche biologische Aktivität wie die besagten peptischen Verbindungen aufweisen.

Als Biomaterialien oder Implantate im erfindungsgemäßen Sinn werden Materialien
10 bezeichnet, die in den menschlichen oder tierischen Körper eingebracht werden können, um die Funktion des entsprechenden funktionsgeschädigten natürlichen Gewebes wiederherzustellen. Hierzu zählen beispielsweise Hüftendoprothesen, künstliche Kniegelenke, Kieferimplantate, Sehnenersatz, Hautersatz, Gefäßprothesen, Herzschrittmacher, künstliche Herzklappen, Brustimplantate, Stents, Katheter
15 und Shunts.

Das Integrationsverhalten von Implantaten in den Körper erweist sich nach wie vor als problematisch. Die Gewebeintegration der Materialien verläuft häufig zu langsam und zu unvollständig, um eine für die Funktionalität ausreichende mechanische
20 Stabilität der Gewebe/Biomaterial-Bindung herzustellen. Ursächlich verantwortlich hierfür ist häufig die Beschaffenheit der Implantatoberfläche, die aufgrund ihrer unzureichenden Grenzflächenkompatibilität bzw. Bioverträglichkeit eine aktive Anlagerung von umliegendem gesunden Gewebe bzw. Zellen behindert. Dies erschwert die Ausbildung einer stabilen Gewebe-Implantat-Grenzschicht und führt damit zu
25 einer inadäquaten Gewebeintegration, die wiederum in Lockerungen, Gewebereabsorption, Infektionen, Entzündungen, Allergien, Microthrombenbildung (Restenose) resultieren. In der Folge werden Revisionseingriffe zum Austausch der Implantate (z. B. Hüftendoprothesen, Kieferimplantate, Katheter oder externe Fixateure) und damit erneute operative Eingriffe erforderlich (Malchau und Herberts, 1996, Pro-
30 gnosis of the Total Hip Arthroplasty, 63. Annual Meeting of the American Academy

of Orthopaedic Surgeons, Atlanta; Haddad et al, 1996, The Journal of Bone and Joint Surgery, 78-B:546-549; Collinge et al., 1996, Pin Tract Infections).

5 Darüber hinaus erweist sich insbesondere bei Hüftendoprothesen die sogenannte
aseptische Implantatlockerung als problematisch, bei der nicht, wie gewünscht,
Knochenzellen und damit Knochengewebe die direkte Verbindung zum Biomaterial
ausbilden, sondern als störende Elemente Fibroblasten und Bindegewebe auftreten.
In der Konsequenz wird die Prothese dadurch anstelle von Knochengewebe von
Bindegewebe umkleidet, wobei die resultierende Stabilität der Prothese-
10 Bindegewebe-Bindung nicht ausreicht, um den mechanischen Anforderungen an die
Kraftübertragung eines künstlichen Hüftgelenks gerecht zu werden. Dies kann in der
Folge zu einer Auslockerung der Prothese führen (Pilliar et al., 1986, Clin. Orthop.,
208:108-113) und erfordert ebenfalls eine Revision. Ein weiteres Beispiel für eine
Anhaftung unerwünschter Zelltypen auf Implantaten stellen Blutplättchen dar, die
15 zur Ausbildung von Microthrombi und damit zu einer gestörten Implantatintegration
führen können (Phillips et al., 1991, Cell 65, 359).

Besonders schwerwiegend wirkt der Mangel an Integrierbarkeit von Biomaterialien
bzw. Implantaten in den Körper im Falle von kompletten Ersatzorganen, da hier die
20 verschiedenartigen Zelltypen in Kontakt mit dem Implantat treten und die erforder-
liche Integrierbarkeit zielgerichtet sein sollte. Um extrem aufwendige Transplanta-
tionsprozeduren mit Hilfe anderer Patienten zu vermeiden, wird beispielsweise an-
gestrebt, die Therapie des Funktionsversagens von Leber, Pankreas, Niere und Milz
immer häufiger im Rahmen des "Tissue Engineering" mittels sogenannter biohybri-
25 der Organe zu vollführen, die aus Trägermaterialien bestehen, welche mit lebenden
Zellen belegt sind und als funktionelle Einheit implantiert werden können. Meistens
werden hierzu funktionsfähige, gesunde Zellen in vitro in resorbierbare oder nicht
resorbierbare Membranen eingeschlossen bzw. verkapselt und als künstliche biohy-
bride Organe oder Hohlorgane in den Patienten transplantiert (z. B.: Lim et al.,
30 1980, Science 210, 908-912; Altman et al., 1982, Horm. Met. Res. Suppl. 12, 43-45;

Zekorn et al., 1989, Transplantation Proceedings 21, 2748-2750; Altman et al., 1982, Horm. Met. Res. Suppl. 12, 43-45; EP 0 504 781 B1). Allerdings treten auch hier sehr oft die beschriebenen Problematiken der fibrösen Einscheidung mit verbundener mangelnder Nährstoffversorgung der Transplantate, immunologischer
5 Abwehrreaktionen durch Zell-Freisetzung aus den Kapseln sowie die Bildung von Blutgerinnseln aufgrund der Thrombogenität der Materialoberflächen auf.

Es ist bekannt, die Gewebeintegration von Biomaterialien/ Implantaten durch Beschichtung derselben mit Peptiden, die die Zell-Adhäsion vermitteln, zu stimulieren.
10 Hierzu kennt man zum einen solche Peptide, die die Tripeptid-Aminosäure-Sequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD), bzw. deren nicht-peptidische Analoga und zum anderen zelladhäsionsvermittelnde, nicht RGD-haltige Peptide (Beispiele siehe unten), bzw. deren nicht-peptische Analoga enthalten, welche bekanntermaßen als integrale Bestandteile vieler Proteine u. a. der extrazellulären Matrix (z. B. Kollagen
15 Typ I, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Entactin, Osteopontin, Thrombospondin) oder der Blutgerinnungskaskade (Fibrinogen, von Willebrand Faktor) als zentrale Erkennungsmuster für die Adhäsion von eukaryontischen Zellen fungieren (z.B.: Pierschbacher und Ruoslahti, 1984, Nature, 309:30-33; Yamada, 1991, J. Biol. Chem., 266:12809-12812). Die erfindungsgemäß definierten Sequenzen werden von
20 den jeweiligen Rezeptoren auf der Zell-Oberfläche, den Integrinen, erkannt und gebunden. Da die Adhäsion von Zellen an die entsprechenden Proteine durch eine Vielzahl verschiedener Integrine vermittelt wird, ist das Integrin-Expressionsmuster einer Zell-Spezies entscheidend für deren Adhäsionseigenschaften an diese Proteine. Das maßgeschneiderte Design und die Synthese von zumeist kurzkettigen, mit den
25 entsprechenden Sequenzen ausgestatteten Peptiden, die selektiv und spezifisch nur an bestimmte Integrine binden können, ermöglicht die zielgerichtete Aktivierung nur derjenigen Zell-Spezies, die diese Integrine exprimieren. So kennt man z. B. RGD-Peptide, die selektiv an α_v -Integrin-Rezeptoren binden und damit bevorzugt die Bindung (Adhäsion) von $\alpha_v\beta_3$ - / $\alpha_v\beta_5$ - tragende Zellen
30 (Osteoblasten, Osteoclasten, Endothelzellen) stimulieren können, ohne gleichzeitig

die Adhäsion von unerwünschten Zellspezies, z.B. $\alpha_{IIb}\beta_3$ -tragende Blutplättchen stimulieren zu können (Haubner et al., 1996, 7, Am. Chem. Soc., 118:7461). Andere RGD-Peptide zeigen dagegen eine umgekehrte Wirkung und binden bevorzugt an $\alpha_{IIb}\beta_3$ - Integrinrezeptoren, so daß sie eine Selektivität z. B. für Blutplättchen aufweisen (Phillips et al., 1991, Cell 65, 359).

Die Beschickung von Implantatoberflächen mit synthetisch zugänglichen, erfindungsgemäß definierten Peptiden ist bekannt. Dabei werden die Peptide entweder durch Adsorption oder aber durch kovalente Bindung auf der Oberfläche mehr oder weniger fixiert. In der DE 1 97 06 667 werden zum Beispiel Biomaterialien beschrieben, die Knochenersatzmaterialien betreffen, die auf einem porösen Polymermaterial basieren, das eine durch Adsorption bedingte Oberflächenbelegung mit Peptiden mit RGD-Aminosäuresequenz aufweist. Aus der WO 91-05036 sind weiterhin metallische Prothesen, insbesondere aus Titan bzw. Titanlegierungen bekannt, an deren Oberflächen Peptide, die u.a. auch RGD-Sequenzen aufweisen können, kovalent gebunden sind. Valentini et al. (May 1997, Transactions of the 23rd Annual Meeting of the Society for Biomaterials, New Orleans, USA) beschreiben die Kovalente Anbindung von RGD-Peptiden an mit einer fluorinierten Ethylenpropylen-Zwischenschicht versehene Titanschrauben. Rezania et al. berichten auf der gleichen Veranstaltung von Siliciumdioxid- bzw. Titandioxid-Oberflächen welche über kovalente Bindung mit aminofunktionalen Organosilanen beschichtet sind und vollführen mittels eines heterobifunktionalen Quervernetzers wiederum kovalent die Anbindung thiolhaltiger RGD-Peptide.

Diese technischen Lösungen gehen jedoch nicht auf das Erfordernis ein, Implantate bzw. Biomaterialien zur Verfügung zu stellen, deren Oberfläche gezielt mit erfindungsgemäß definierten Peptiden beschichtet sind, die selektiv an den jeweiligen Zelltyp des das betreffende Implantat umgebenden Gewebes angepaßt sind.

Es wäre daher wünschenswert, Biomaterialien in der Art verändern zu können, daß gezielt diejenigen Gewebe oder Zell-Spezies, die auch nach Einbringen des Implantats in den Körper mit diesem aktiv in Funktion treten sollen, also z. B. Knochenzellen bei Hüftendoprothesen oder Epithelzellen für Haut-, Haar- oder Zahnersatz, ausschließlich oder bevorzugt zu deren Gewebeintegration veranlaßt werden, während gleichzeitig diesen Prozeß störende Zell-Spezies, wie z. B. Blutplättchen oder Fibroblasten, die die Ausbildung von Microthrombi bzw. Bindegewebskapseln fördern, an einer selektiven Wechselwirkung mit dem Implantat behindert werden sollen.

Es wäre ferner eine wünschenswerte und attraktive Strategie, Implantate mit denjenigen erfindungsgemäß definierten Peptiden (bzw. deren nicht-peptidischen Analoga) zu beschichten, die die Adhäsion derjenigen ausgewählten Zelltypen ausschließlich oder zumindest bevorzugt stimulieren, welche die entsprechenden komplementären Integrine tragen, was in der Folge zur beschleunigten in vivo-Synthese des entsprechenden ausgewählten Gewebes führt.

Hinsichtlich der Entwicklung kompletter biohybrider Organe (Haut, Blutgefäße, Harnwege, Blase, Ösophagus, Pankreas, Leber, Milz, Niere) wäre es ein entscheidender Fortschritt, die jeweils für ein bestimmtes Organ gewünschten verschiedenen Zell-Spezies durch Beschichtung unterschiedlicher Oberflächenteile eines Implantats mit verschiedenen zellselektiven erfindungsgemäß definierten Peptiden zielgerichtet, räumlich definiert und koordiniert zur Durchführung unterschiedlicher zellulärer in vivo-Prozesse aktivieren zu können.

Die vorliegende Erfindung beschreibt nun die Möglichkeit der Biofunktionalisierung von Biomaterialien, insbesondere Implantaten für alle denkbaren Organe durch deren Beschichtung mit synthetisierten zell- bzw. gewebe-selektiven erfindungsgemäß definierten RGD-Peptiden, die in vitro die Adhäsion vorwiegend derjenigen Zell-Spezies stimulieren, die jeweils die Gewebeintegration des entsprechenden

Biomaterials vollführen sollen und die gleichzeitig in vitro die Adhäsion vorwiegend derjenigen Zell-Spezies, die diesem Prozeß entgegenwirken, nicht stimulieren. Mit der Verwendung solcher Beschichtungen ist eine beschleunigte und die verstärkte Integration verschiedener Biomaterialien/Implantate mit verbesserter Langzeitstabilität nach deren Einbringen in den Körper zu erzielen.

Darüber hinaus bestehen mit diesem Konzept der Beschichtung verschiedener Materialoberflächenteile eines Implantats mit unterschiedlichen erfindungsgemäß definierten Peptiden alle Möglichkeiten zur Entwicklung von „intelligenten“, biohybriden Organen ("Tissue Engineering"), die die biologische Information zur selektiven Aktivierung verschiedener Zielgewebe bzw. Zielzellen tragen und damit durch Selbstorganisation in den Körper integriert werden und hierdurch eine Gewebeintegration verstärken oder gar erst ermöglichen können.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Implantat, welches geeignet für unterschiedliche menschliche und tierische Organe ist, bestehend im wesentlichen aus einer Trägermatrix und einer diese Matrix umhüllenden Peptid-Beschichtung, die zur zielgerichteten Adhäsionsstimulierung von menschlichen oder tierischen Körperzellen verschiedene oder gleichartige Peptide enthält, welche Sequenzen aufweisen, die Bindungsstellen auf den für die Adhäsion verantwortlichen Integrin-Rezeptoren auf humanen oder tierischen Zellen erkennen, wobei die Trägermatrix reaktive bindungsfähige Gruppen an ihrer Oberfläche aufweist, die dazu befähigt sind mit entsprechenden funktionellen reaktiven Gruppen besagter Peptidschicht eine stabile kovalente Bindung einzugehen, wobei das Implantat sich dadurch auszeichnet, daß besagte Peptide so lokal unterschiedlich auf der Oberfläche des Implantats angeordnet sind, daß sie aufgrund ihrer entsprechend unterschiedlichen strukturellen, zelladhäsions-stimulierenden Aktivität spezifisch dem natürlichen unterschiedlichen komplementären Integrinmuster der in jeweiligen Region an sie angrenzenden Gewebezellen entsprechen, in die das Implantat eingebracht werden soll, wodurch ein lokal differenziertes und selektives bioaktives Beschichtungsmuster der Implantatoberfläche vorliegt.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung von für Organe/Gewebe geeigneten Implantaten auf Basis einer anorganischen Trägermatrix, die eine Oberfläche besitzen, welche mit die Zelladhäsion stimulierenden Peptiden beschichtet sind, wobei die besagten Peptide selektiv in Bezug auf das komplementäre Integrinmuster der an das Implantat unmittelbar angrenzenden Gewebezellen sind, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man nach an sich bekannten Methoden (i) in vitro die Integrinrezeptor-Struktur der Zielzellen bzw. des Zielgewebes, in welches das Implantat in vivo eingebracht werden soll, bestimmt, (ii) die Peptide mit der entsprechenden komplementären Struktur auswählt bzw. synthetisiert und (iii) die besagten Peptide an die betreffende Oberfläche des Implantats bindet.

Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung Verfahren und Implantate/Biomaterialien mit folgenden Charakteristika: die besagten Peptide, insbesondere RGD-Peptide sind durch kovalente Bindung, gegebenenfalls über verzweigte, oberflächenvergrößernde Moleküle und/oder Molekülanker an die Implantatoberfläche fixiert; bevorzugt werden RGD-Peptide verwendet, die $\alpha_v\beta_3$ -/ $\alpha_v\beta_5$ -tragende Zellen, insbesondere also beispielsweise die Adhäsion von Osteoblasten, Osteoclasten, Endothelzellen stimulieren können und gleichzeitig die Adhäsion von Blutplättchen oder Fibroblasten nicht zu stimulieren in der Lage sind; als Trägermatrices werden geformte oder ungeformte Teile aus Keramik, Polymermaterial oder Metall oder ein biohybrides Organ oder Hohlorgan eingesetzt.

Die erfindungsgemäß definierten Peptide sind auf molekularer Ebene im wesentlichen aus folgenden Bestandteilen konzipiert:

- einer die für die Adhäsion zuständige Aminosäuresequenz-tragenden Domäne (z.B. die genannte RGD-Sequenz), die selektiv eine ausgewählte Zell-Spezies erkennt und bindet.
- einem Abstandshalter, um die zellerkennende und die Erkennungssequenz-tragende Domäne den Zellen in solcher Art zu präsentieren, daß eine Zellbindung unter sterischen Gesichtspunkten erst möglich wird.

- einem Molekülanker, der die stabile Anbindung des betreffenden Peptid-Derivats an die Biomaterial- bzw. Implantatoberfläche vollzieht.
- optional kann die Zell-Adhäsion durch zusätzliche Kopplung der erfindungsgemäß definierten Peptide an verzweigte Molekülstrukturen (sogenannte Dendrimere oder
5 Tentakel) die einen oberflächenvergrößernden Effekt ausüben, bevor die Bindung an die Biomaterialoberfläche erfolgt, gesteigert werden.

Unter der Oberfläche des Biomaterials bzw. Implantats ist erfindungsgemäß nicht nur die unmittelbare Oberfläche der Trägermatrix zu verstehen, sondern auch eine
10 gegebenenfalls vorhandene zusätzliche Beschichtung aus beispielsweise polymerem Material, natürlichen oder artifiziellen Knochenmaterialien, Proteinen oder Protein-derivaten.

Als Trägermatrix eignen sich vor allem Materialien aus Keramik, Metall, Polymermaterialien (z.B. PMMA) oder vorzugsweise resorbierbaren Knochenersatzma-
15 terialien. Besonders geeignet sind resorbierbare bzw. bio-abbaubare Werkstoffe, z. B. aus Polylactiden, insbesondere racemische D,L Polylactid-Verbindungen oder re-sorbierbare Calciumphosphat-bzw. Hydroxyl-apatit- Mischungen, die bewirken können, daß der ursprüngliche Gewebezustand wiederhergestellt werden kann und wie sie beispielsweise aus der WO 96/36562 oder der EP 0 543 765 bekannt sind. Je
20 nach Einsatzgebiet kann als Trägermatrix auch Collagen oder Agar geeignet sein.

Unter dem Begriff "biohybrides Organ" ist eine üblicherweise anorganische Matrix zu verstehen, die mit lebenden Zellen auf irgendeine Weise beladen bzw. verbunden sind (siehe oben). Erfindungsgemäß ist darunter auch eine entsprechende Anordnung
25 zu verstehen, die frei von Zellen ist und nur die entsprechenden verschiedenartigen erfindungsgemäß definierten Peptide auf unterschiedlichen Implantat-Oberflächen-teilen aufweist, welche, in das defekte Gewebe eingebracht, selektiv die umgeben-den Zellen zu aktivieren vermögen. Der Vorteil solcher azellulärer biohybrider Or-gane besteht darin, daß „intelligente“, biokompatible Implantate, die kostengünstig
30 und kontrollierbar produziert werden können, die biologische Information zu einer

Organregeneration tragen. Die Integration solcher biohybriden Organe in den Körper wird dann durch körpereigene Regenerationsprozesse mittels Selbstorganisation vollzogen, wodurch immunologische Abwehrreaktionen, wie sie beispielsweise durch implantierte Fremd-Zellen oder Fremd-Proteine oft auftreten, vermieden werden können.

Die Implantate liegen erfindungsgemäß in der Regel in Formkörpern bzw. Prothesen vor, wobei der Formkörper dem jeweiligen Gewebe- / Knochendefekt angepaßt sein sollte. Im Falle biohybrider Organe können die Prothesen lediglich aus mit oder ohne entsprechende Zellen und den erfindungsgemäß definierten Peptiden beschichteten Membranen oder Folien bestehen oder aber die Anordnungen, wie sie z. B. aus der EP 0 504 781 bekannt sind, aufweisen.

Als erfindungsgemäß einsetzbare Peptide kommen alle Peptide und deren Verbindungen mit nichtpeptidischen Substituenten, die eine für die Zelladhäsion verantwortliche Domäne bzw. Aminosäuresequenz enthalten und die über ihre peptidischen und nichtpeptidischen Substituenten auf den Implantatoberflächen binden können, in Betracht. Insbesondere kommen entsprechende Peptide mit einer RGD-Sequenz in Frage.

Folgende Aufzählung von bevorzugten Peptiden bzw. Peptidverbindungen soll lediglich beispielhaften und keinerlei limitierenden Charakter haben, wobei folgende Abkürzungen verwendet werden:

	Asp (D)	=	Asparaginsäure
	Gly (G)	=	Glycin
25	Arg (R)	=	Arginin
	Tyr(Y)	=	Tyrosin
	Ser(S)	=	Serin
	Phe(F)	=	Phenylalanin
	Lys (K)	=	Lysin
30	DPhe (f)	=	D-Phenylalanin

- 11 -

	Pro(P)	=	Prolin
	Leu(L)	=	Leucin
	Ile(I)	=	Isoleucin
	Val(V)	=	Valin
5	Glu(E)	=	Glutaminsäure
	Thr(T)	=	Threonin
	Ala(A)	=	Alanin

(a) Beispiele für geeignete RGD-haltige Peptide:

- 10 RGD (Arg-Gly-Asp),
GRGD (Gly-Arg-Gly-Asp),
GRGDY (Gly-Arg-Gly-Asp-Tyr),
RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser),
GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser),
15 RGDF (Arg-Gly-Asp-Phe),
GRGDF (Gly-Arg-Gly-Asp-Phe),
cyclo-RGDfK (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys),
cyclo-RGDfKG (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys-Gly).

(b) Beispiele für geeignete nicht RGD-haltige Peptide:

- LDV (Leu-Asp-Val),
LGTIPG (Leu-Gly-Thr-Ile-Pro-Gly),
REDV (Arg-Glu-Asp-Val),
IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val),
25 YIGSRG (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-Gly),
LRE (Leu-Arg-Glu),
PDSGR (Pro-Asp-Ser-Gly-Arg),
DGEA (Asp-Gly-Glu-Ala),
RYVVLPR (Arg-Tyr-Val-Val-Leu-Pro-Arg),
30

Die erfindungsgemäß definierten Peptide können sowohl linear als auch zyklisch sein. Die oben genannten Peptide bzw. Peptidsequenzen können auch innerhalb längerer Peptide mit je nach ausgewähltem erfindungsgemäßen Peptid etwa insgesamt 4 bis 20 Aminosäuren vorkommen. Ebenso sind Aminosäuren, welche D- oder L-Konfiguration aufweisen oder die C- und /oder N-alkyliert sind, erfindungsgemäß mit umfaßt. Unter zyklischen Peptiden werden erfindungsgemäß solche Peptide verstanden, die über eine Amidbindung ringförmig geschlossen sind, wobei im Molekül vorzugsweise keine freien Carboxyl- oder Amino-Gruppen vorhanden sind. Besonders bevorzugt sind erfindungsgemäß RGD-Peptide, insbesondere solche aus der oben genannten Liste und hiervon besonders das Pentapeptid RGDfK, welches in seiner zyklischen Form aus der DE-OS-1 95 38 741 bekannt und spezifisch für Osteoblasten ist sowie das ebenfalls in seiner zyklischen Form vorliegende Hexapeptid RGDfKG, das spezifisch für Thrombozyten ist.

Entsprechende erfindungsgemäß definierte lineare und zyklische Peptide sind zum Beispiel in folgenden Patentanmeldungen beschrieben: EP 0 632 053, EP 0 655 462, EP 0578 083, EP 0 770 622, DE 1 95 38 741. Insbesondere sind jene Peptide geeignet, die selektiv an $\alpha_v\beta_3$ -/ $\alpha_v\beta_5$ -Integrin-exprimierende Zell-Spezies (z. B. Osteoblasten, Osteoclasten, Endothelzellen) binden, ohne gleichzeitig an z.B. $\alpha_{IIb}\beta_3$ -tragende Zellspezies (z.B. Blutplättchen) zu binden. Die Peptide sowie die entsprechenden Derivate können nach Standardmethoden leicht synthetisiert werden, sofern sie nicht anderweitig erhältlich sind.

Prinzipiell können die erfindungsgemäß definierten Peptide an die Oberfläche des Biomaterials durch Adsorption oder Kovalenzbindung fixiert sein. Die Adsorptionsmethode ist bei Verwendung unterschiedlicher Peptide an ein und demselben Implantat weniger gut geeignet, da die erfindungsgemäß lokal selektive unterschiedliche Belegung der Oberfläche mit dieser Technik nur schwer zufriedenstellend zu bewerkstelligen ist.

Die Kopplung der Peptide bzw. deren nicht-peptidische Analoga an Trägeroberflächen durch Kovalenzbindung meist mittels sogenannter Molekülanker ist per se hinreichend bekannt und beschrieben worden, so beispielsweise bei Singer et al. (1987, J.Cell.Biol. 104: 573); Brandley, Schnaar (1989, Develop. Biol. 135: 74); Massia, Hubbell (1990, Anal. Biochem. 187: 292); Hirano et al. (1991, J. Biomed. Mat. Res. 25: 1523); Lin et al. (1992, Biomaterials 13: 905); Nicol et al. (1992, J. Biomed. Mat. Res. 26: 393); Dee et al. (1995, Tissue Engin. 1: 135), ohne daß dabei allerdings auf die Beschichtung von Implantaten im allgemeinen und im speziellen in irgend einer Weise eingegangen wäre.

10

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind nun neue Anwendungen von an sich bekannten Beschichtungsmethoden zur Herstellung der erfindungsgemäßen Implantate, wie zum Beispiel das "Kevloc[®]"-Verfahren (EP 0 712 621), welches erstmals erfindungsgemäß zur Kopplung der genannten Peptide (bzw. deren nicht-peptidische Analoga) an Oberflächen, welche Acryloyl- bzw. Methacryloyl-Ankerkomponenten enthalten, eingesetzt wurde, oder das "Silicoater[®]"-Verfahren (DE-OS 42 25 106), das hier erfindungsgemäß zur Kopplung der entsprechenden Peptide mittels Acryloyl- oder Methacryloyl-Ankerkomponenten in der Regel über eine Acryloyl-/Methacryloyl-Silanderivat-Zwischenschicht (z.B. 3-Methacryloxypropyl-trimethoxysilan) an die entsprechenden Trägermatrices verwendet wurde. Eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäß definierten Peptide an die Oberfläche der Trägermatrix bzw. des Implantats zu binden, besteht in der analogen Anwendung eines Silanisierungsverfahrens, das in der DE-OS 43 21005 beschrieben ist, welches ursprünglich die technische Lehre der Beschichtung von Perlglanzpigmenten für Wasserlacksysteme für Metalle und Kunststoffe in der Automobil- und Kunststoffindustrie darlegt. Ferner ist erfindungsgemäß ein Verfahren für die Beschichtung von Goldoberflächen mit thiolgruppentragenden Peptiden geeignet, das ursprünglich in einem anderen Zusammenhang beschrieben wurde (Heuvel et al., 1993, Analytical Biochem. 215: 223)

30

Die geschilderten Verfahren sind bislang für die Beschichtung von Implantaten zwecks deren Bioaktivierung noch nicht eingesetzt worden.

5 Die Kopplung der entsprechenden erfindungsgemäß definierten Peptide an die Implantatoberfläche erfolgt erfindungsgemäß über entsprechende Ankermoleküle, d.h. das Peptid wird in der Regel nicht unmittelbar selbst auf die Implantatoberfläche fixiert. Die Einfügung eines solchen, unten näher definierten Moleküls hat vor allem den Sinn, den sterischen Erfordernissen des biologischen Rezeptors auf den Zielzellen in Zusammenhang mit der Bindung des entsprechenden Peptids Rechnung zu
10 tragen.

Die Implantatoberfläche muß hierzu entsprechende funktionelle Gruppen bzw. reaktive Einheiten tragen, welche eine Bindung der entsprechenden funktionellen Gruppe des Ankermoleküls ermöglichen. Die funktionellen Gruppen, die auf der Implantatoberfläche bereitzustellen sind, richten sich wiederum nach der Beschaffenheit der eigentlichen je nach Erfordernis unterschiedlichen Trägermatrix (Metall,
15 Kunststoff, Knochenmaterialien). Bei Metallimplantaten, kann man beispielsweise eine für SH-Reste des Ankermoleküls reaktive Oberflächenschicht durch Bedampfung mit Gold erzeugen. Die Silanisierung von Metalloberflächen nach bekannten Verfahren (siehe oben) führt ebenfalls zu reaktiven Oberflächen, welche mit den
20 geeigneten erfindungsgemäßen Ankermolekülen, ggf. unter Verwendung von silanhaltigen Haftvermittlern, Verbindungen eingehen können (siehe unten). Implantate aus natürlichen Knochen oder naturähnlichen Knochenmaterialien (z. B. Calciumphosphat-Zemente) können Ankermoleküle binden, welche eine reaktive Phosphonatgruppe enthalten (Prinzip beschrieben bei Chu, Orgel, 1997, Bioconjugates
25 Chem. 8: 103). An Implantate aus Kunststoff auf Acrylatbasis (z. B. PMMA) oder aus anderen Materialien mit einer entsprechenden Kunststoffbeschichtung können wiederum erfindungsgemäße Ankermoleküle angekoppelt werden, die ihrerseits selbst einen reaktiven Acrylatrest aufweisen.

Ankermoleküle im Sinne der Erfindung sind also Moleküle auf Basis von modifizierten bzw. substituierten Alkylketten bzw. Kohlenstoffketten, die zumindest zwei unterschiedliche funktionelle Gruppe aufweisen, wobei eine funktionelle Gruppe in der Regel ein freier Carboxyl-Rest (freie NH_2 -Gruppe) ist, der mit einer freien NH_2 -Gruppe (freie Carboxylgruppe) einer Seitenkette eines erfindungsgemäß definierten Peptids, insbesondere eines RGD-Peptids, eine Amidbindung ($-\text{CO}-\text{NH}-$) erzeugt, und die andere funktionelle Gruppe, welche vorzugsweise am anderen Ende der C-Kette des Ankermoleküls lokalisiert ist und eine direkte oder indirekte Bindung mit der Implantatoberfläche bewirkt, je nach Beschaffenheit bzw. Erfordernis der Implantatoberfläche, vorzugsweise ein (meth)acrylathaltiger Rest oder eine Mercapto-
gruppe ist. Prinzipiell können auch andere funktionelle Gruppen verwendet werden, die mit den jeweiligen reaktiven Gruppen unmittelbar auf der Implantatoberfläche oder auf einer geeigneten Zwischenschicht zu einer stabilen Bindung zu reagieren vermögen.

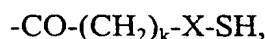
Die Ankermoleküle der Erfindung besitzen, wie bereits angedeutet, gleichzeitig die Funktion von Abstandshaltern oder Spacern, weisen also neben ihren geschilderten Verknüpfungsoptionen eine entsprechende gegebenenfalls spezifisch angepaßte Länge auf, um zu ermöglichen, daß die für die Zelladhäsionsstimulierung verantwortliche Domäne den richtigen Abstand zur Zielzelle hat, so daß eine Zellbindung unter sterischen Gesichtspunkten verbessert oder erst ermöglicht werden kann.

Die biologische Funktion der zellerkennenden und die entsprechende Aminosäuresequenz-tragenden Domäne wurde beispielhaft anhand eines selektiv an $\alpha_v\beta_3$ -/ $\alpha_v\beta_5$ -Integrin-exprimierende Zell-Spezies (z. B. Osteoblasten, Osteoclasten, Endothelzellen) bindendes synthetisiertes Peptid bewiesen (Haubner et al., 1996, J. Am. Chem. Soc., 118:7461-7472).

Die Ankermoleküle der Erfindung weisen vorzugsweise folgende lineare Strukturen auf, wobei die erfindungsgemäß definierten Peptide über die NH_2 -Gruppe einer ihrer Aminosäure-Seitenketten, vorzugsweise Lysin-Seitenkette an das freie Carboxyl-Ende des jeweiligen Ankermoleküls gebunden werden.

5

(i) *Mercapto(amido)carbonsäure-Derivate:*



wobei X eine Einfachbindung oder $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_l-$,

$k = 2$ bis 12 und $l = 2$ bis 4 bedeutet;

10

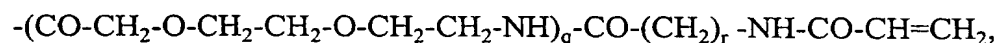
(ii) *Acrylamidocarbonsäure-Derivate:*



wobei $m, n = 2$ bis 8 ; $p = 0$ bis 2 bedeuten,

15

(iii) *Acrylamido-amidotriethylenglycolsäure-Derivate*



wobei $q = 1$ bis 3 und $r = 2$ bis 8 bedeutet.

Bevorzugt sind insbesondere die folgenden Typen spezieller Ankermoleküle:

20

(ia) - $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$ (Mercaptopropionsäure),

(ib) - $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$
(Mercaptoethylamidobornsteinsäure),

(iia) - $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ (Acrylamidohexansäure),

(iib) - $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$

25

(Acrylamidohexansäure-amidohexansäure),

(iiia) - $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$
(Acrylamidohexansäure-amidotriethylenglycolsäure)

(iiib) - $-(\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH})_2-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$
(Acrylamidohexansäure-di-amidotriethylenglycolsäure).

30

Generell sind erfindungsgemäß jene Ankermolekülstrukturen bevorzugt, welche in der linearen C-Kette mindestens sechs C-Atome aufweisen. Es wurde nämlich überraschend gefunden, daß diese Länge des Ankermoleküls besonders günstig ist, um optimale Ergebnisse in bezug auf die beschleunigte und verstärkte Gewebeintegration des Implantats zu erzielen. Die Angabe von mindestens sechs C-Atomen in der linearen Kette bezieht sich erfindungsgemäß auf die Gesamtlänge des Moleküls zwischen Peptid und Implantatoberfläche. So sind auch Ankermoleküle der oben gezeigten Strukturen mit kürzerer Kette (z.B. Typ ia) geeignet, falls noch andere nicht genannte, kettenverlängernde Kopplungskomponenten zwischen Peptid und Implantatoberfläche eingefügt werden.

Die Ankermoleküle werden nach Standardmethoden mit den erfindungsgemäß definierten Peptiden über die Carboxyl-Funktion amidartig verbunden, wodurch Strukturen des Typs Peptid - NH-CO- Ankermolekül entstehen, welche wiederum, wie dargelegt, auf dem Implantat fixiert werden, wodurch wiederum Konstrukte des folgenden Typs entstehen: Peptid - NH - CO - Ankermolekül- Implantat(oberfläche). Bevorzugt sind entsprechende Implantat-Konstrukte, welche sich zusammensetzen aus einem der oben einzeln genannten definierten Peptide, insbesondere RGD-Peptide, einem der oben einzeln aufgeführten allgemeinen und speziell definierten Ankermoleküle und einem entsprechend oberflächenreaktiven Implantat. Besonders bevorzugt sind folgende Implantate:

cyclo-RGDfK NH-CO - Thiol-Derivate (Typ: i) - Implantat,
cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Derivate (Typ: ii) - Implantat,
cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Glycol-Derivate (Typ: iii) - Implantat,
cyclo-RGDfKG NH-CO - Acrylat-Glycol-Derivate (Typ: iii) - Implantat,

worin die lineare C-Kette des gesamten Ankermoleküls mindestens sechs C-Atome aufweist.

Darunter sind insbesondere bevorzugt:

cyclo-RGDfK NH-CO - Thiol-Derivat (Typ: ib) - Implantat

cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Derivat (Typ: iia) - Implantat

cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Derivat (Typ: iib) - Implantat

5 cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Glycol-Derivat (Typ: iia) - Implantat

cyclo-RGDfKG NH-CO - Acrylat-Glycol-Derivat (Typ: iia) - Implantat

cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Glycol-Derivat (Typ: iib) - Implantat

10 Die Herstellung dieser bevorzugten Strukturen erfolgt nach Standardmethoden, bzw. ist weiter unten, oder in der am gleichen Tag angemeldeten Parallelanmeldung des Anmelders, die die Peptid-Ankerstrukturen als solche zum Gegenstand hat, beschrieben.

15 Wie bereits weiter oben angesprochen, werden zur Verankerung der beschriebenen zell- bzw. gewebe selektiven Peptid-Derivate an Biomaterialoberflächen gemäß der Erfindung im wesentlichen drei Alternativwege verfolgt, wobei das molekulare Erkennungsmuster der die jeweilige RGD-Sequenz tragenden Domäne selektiv für einen bestimmten Zelltyp sowie der Abstandshalter unverändert bleiben können, während der Molekülanker je nach den aufgeführten Kopplungsvarianten, variiert werden kann, beispielsweise durch:

- 20 - Kopplung von Thiol-Peptid-Derivaten an goldbeschichtete Biomaterialoberflächen (z.B. mit Typ (i) Ankermolekülen);
- Kopplung von (Meth)Acryloyl-Peptid-Derivaten an acrylat- bzw. methacrylat beschichtete Biomaterialoberflächen (z.B. mit Typ (ii) oder (iii) Ankermolekülen);
- 25 - Kopplung von (Meth)Acryloyl-Peptid-Derivaten an silanbeschichteten Biomaterialoberflächen (z.B. mit Typ (ii) oder (iii) Ankermolekülen) mit einem (Meth)Acryloyl-Silan-derivat als Haftvermittler bzw. Zwischenschicht (z. B. 3-Methacryloxypropyl-trimethoxysilan).

Die Erzielung der kritischen Mindestlänge des Ankermoleküls für verschiedene Peptid-Kopplungsvarianten an Biomaterialoberflächen erfolgt durch Synthese der erfindungsgemäß definierten Peptide mit den erfindungsgemäß definierten Anker-
molekülen von einer Kettenlänge mit vorzugsweise 6 bis 24 C-Atomen und wahl-
weise unterschiedlichen Hydrophobie- / Hydrophilie - Eigenschaften (z. B. durch
5 Verwendung zahlenmäßig unterschiedlicher Einheiten von $-\text{CH}_2-$ und / oder Amido-
hexansäure oder Ethylenglycol nach an sich Standardmethoden und anschließender
Testung der biologischen Wirksamkeit durch Bestimmung der Zelladhäsion in
vitro nach Beschichtung entsprechender Biomaterialoberflächen).

10

Auf die beschriebene Weise kann je nach den Materialeigenschaften des Implantats
ein geeignetes Beschichtungsverfahren zur Konditionierung der Oberflächen vor der
eigentlichen Kopplung mit den erfindungsgemäßen Peptid-Derivaten ausgewählt
werden. Darüber hinaus ist in Abhängigkeit vom Gewebetyp bzw. dem Zelltyp, der
15 die Integration des Biomaterials / Implantats vollführen soll, die Beschichtung mit
anderen Peptiden möglich, die wiederum zielgerichtet die Integrine der entsprechen-
den Ziel-Zell-Spezies aktivieren, wie z. B. das $\alpha_6\beta_4$ -Integrin von Epit-
helzellen (z. B. zum Einsatz von Knochen-, Kiefer-, Haut- oder Haarimplantaten)
oder das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin von Blutplättchen. $\alpha_v\beta_3$ -spezifische RGD-
20 Peptide weisen eine Selektivität gegenüber Endothelzellen und Osteoblasten auf,
wodurch sie sich z. B. zur Beschichtung von Gefäßprothesen oder Knochenimplan-
taten eignen würden. Hierdurch kann für Implantate auf dem Gebiet des Knochen-,
Gefäß, Zahn-, Haut- und Haarersatzes für nahezu jedes beliebige Organ eine geeig-
nete bioaktivierende Oberflächenbeschichtung realisiert werden.

25

Ehe entsprechende erfindungsgemäße Implantate oder biohybride Organe bereitge-
stellt werden können, müssen zuvor die für den jeweiligen Zelltyp geeigneten Pepti-
de in einem *in vitro*-Testsystem auf biologische Wirksamkeit geprüft und ermittelt
werden, um später eine gezielte und selektive Beschichtung des Implantats, welches
30 in das ausgesuchte Gewebe eingebracht werden soll, vornehmen zu können.

- Die hierfür notwendige Analyse der Integrin-Rezeptor-Struktur des Zielgewebes bzw. der Zielzellen, in welches das Implantat eingebracht werden soll, erfolgt mittels gängiger, bekannter, immunhistologischer Verfahren, wie z. B. mittels Immunfluoreszenz oder der Immunhistochemie von Gewebeproben. Die hierfür erforderlichen Antikörper gegen verschiedene Integrin-Rezeptoren bzw. deren Untereinheiten sind mittlerweile bekannt und stehen zur Verfügung oder können entsprechend mittels an sich bekannter Standardmethoden, wie beispielsweise geeigneter Immunisierungen, erzeugt werden.
- 10 Die erfindungsgemäß definierten Peptide werden in verschiedenen Konzentrationen kovalent an Kulturoberflächen beispielsweise aus mit Rinderserumalbumin (BSA) beschichteten Polystyrol gekoppelt. Das Material dieses Testträgers spielt bei der Ermittlung der geeigneten Peptide keine essentielle Rolle. Ebenso ist die angewendete Kopplungsmethode hier noch von geringer Bedeutung. Aus praktischen Gründen kann die Kopplung bei diesen Ermittlungen auch mittels Inkubation und Adsorption der besagten Peptide an den Testträger erfolgen.
- 15 Anschließend wird die Adhäsion von ausgesuchten Gewebe-Zellkulturen (z. B. Osteoblasten), die den Zellen, die *in vivo* im natürlichen Gewebe aktiviert werden sollen, in ihren Adhäsionseigenschaften zu entsprechen vermögen, an die entsprechend beschichteten Oberflächen untersucht. Das Kriterium zur Auswahl geeigneter Zellkulturen für die Adhäsionsexperimente besteht im vergleichbaren Integrationsexpressionsmuster zu den Zielzellen *in vivo* nach Implantation, zum Beispiel deren $\alpha_v\beta_3$ -/ $\alpha_v\beta_5$ - oder $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Expression, die mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen $\alpha_v\beta_3$ -, $\alpha_v\beta_5$ - oder $\alpha_{IIb}\beta_3$ - Integrine bzw. gegen die α_v -, α_{IIb} -, die β_3 - bzw. gegen die β_5 -Untereinheiten des Integrin-Rezeptors anhand eines Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) verifiziert wird. Bei anderen Ziel-Zell-Spezies *in vivo* mit unterschiedlichen Integrinrezeptor-Muster müssen entsprechend andere Antikörper eingesetzt werden. Solche sind mittlerweile bekannt und stehen zur Verfügung oder können entsprechend bekannter Standardmethoden z. B. mittels geeigneter Immunisierung erzeugt werden.
- 20
- 25
- 30

Die verschiedenen selektierten Zell-Spezies werden auf mit den in Frage kommenden Peptiden beschichteten, BSA-vorbehandelten Polystyrol-Kulturoberflächen angesät und inkubiert. Anschließend werden nicht adherierte Zellen abgewaschen.

Das Bindungsverhalten der unterschiedlichen, ausgewählten Zell-Spezies an den mit unterschiedlichen erfindungsgemäß definierten Peptiden beschichteten Testoberflächen entspricht im positiven Fall, das heißt, wenn eine ausreichende Spezifität vorliegt, jeweils einer Titrationskurve mit einer maximalen Adsorptionsrate von etwa 60 bis 100 % der angesäten Zellen sowie einer halbmaximalen Zellanbindung bei einer RGD-Peptid -Konzentration in der Beschichtungslösung von etwa 5nM bis 5µM.

In ähnlicher Weise, wie für die Kopplung geeigneter Peptide an BSA-vorbeschichteten Polystyroloberflächen beschrieben, sind Verankerungsstrategien an modifizierte bzw. konditionierte Biomaterialoberflächen unter Verwendung verschiedener Haftvermittlungszwischenschichten möglich.

15

Zusammengefaßt, läßt sich folgendes sagen:

Die Implantate des Standes der Technik weisen folgende Nachteile auf:

- unvollständige, langsame Implantatintegration ins Gewebe,
- eingeschränkte Akzeptanz im Gewebe,
- 20 - unzureichende funktionelle Stabilität der Implantat/Gewebegrenzschicht
- mangelnde stimulierende Wirkung des Implantats auf die Gewebeneogenese
- unphysiologische Eigenschaften der Implantatoberfläche.

Als Konsequenzen hieraus ergaben sich weitere Probleme:

- aseptische Implantatlockerungen (z.B. fibröse Kapselbildung)
- 25 - lokale Bildung von Mikrothrombi,
- Infektionen,
- Entzündungen,
- Geweberesorptionen,
- Revisionen.

30

Diese Probleme können durch das bereitgestellte erfindungsgemäße Verfahren bzw. der hierdurch erzeugten Implantate weitgehend beseitigt werden. Die erfindungsgemäßen Gegenstände zeichnen sich aus durch:

- maßgeschneidertes Design von Adhäsionspeptiden, welche komplementär zum Integrin-Expressionsmuster der Zielgewebe / Zielzellen sind;
- selektive Stimulierung der Zelladhäsion der Zielzellen, die die Gewebeneogenese vollführen sollen, ohne gleichzeitig die Adhäsion der Zellen, die den Prozeß behindern, zu adherieren;
- Beschichtungen höherer Stabilität mittels neuartiger Peptid-Anker-Moleküle;
- Beschleunigung und Verstärkung des Implantat-Integrationsprozesses in das Gewebe.

Es konnte gezeigt werden, daß der kritische sterische absolute Mindestabstand zwischen Zellerkennungssequenz auf dem Peptid und unbeschichteter Materialoberfläche zwischen 2,0 und 3,5 nm, vorzugsweise zwischen 2,5 und 3,5 nm liegt. Maximale Belegungsraten (80 - 100%) können bei einem Mindestabstand von 3,0 bis 5,0 nm erzielt werden.

Kurze Beschreibung der Abbildungen:

20

Abb.1: Analyse der Integrinzusammensetzung von primären Human-Osteoblasten durch FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) mittels fluoreszenzkonjugierter Antikörper gegen $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrine.

25

x-Achse: Fluoreszenzintensität (Counts)

y-Achse: Zellzahl

M21: $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ - Positivkontrollen

M21: $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ - Negativkontrollen

HOB: Kultur primärer Human-Osteoblasten

30

ROB: Kultur primärer Ratten-Osteoblasten

Abb. 2: Adhäsion von MC3T3 H1-Osteoblasten an mit verschiedenen RGD-Peptiden über BSA beschichteten Polystyrol-Testoberflächen.

x-Achse: RGD-Peptid Konzentration in der Beschichtungslösung, (μM),

y-Achse: Zell-Belegungsgrad (%);

5 *obere Kurve:* cyclo-RGDfK NH - CO-CH₂-CH₂-S-(Sulfo-SMPB) ("Thiolpeptid 1-SMPB-Derivat"), SMPB = Succinimidyl-4 (p-Maleimido-phenyl)-Butyrat;

mittlere obere Kurve: cyclo-RGDfK NH-CO-CH₂-CH₂-CO-NH-CH₂-CH₂-S-(Sulfo-SMPB) ("Thiolpeptid 2-SMPB-Derivat")

10 *mittlere untere Kurve:* cyclo- RGDvE CO-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH-CH₂-CH₂-S- (Sulfo SMPB) ("Thiolpeptid 3-SMPB-Derivat")

untere Kurve: Thiolpeptid-Kontrolle: cyclo-R β ADfK-NH- CO-CH₂-CH₂-S-(Sulfo-SMPB)

15 Abb. 3: Adhäsion von Osteoblasten an mit Thiolpeptid 1-SMPB-Derivat beschichteten Testoberflächen (s. unter Abb. 2):

x-Achse: Peptidkonzentration in der Beschichtungslösung (μM),

y-Achse: Zell-Belegungsgrad (%),

obere Kurve: MC3T3 H1-Mäuse-Osteoblasten;

20 *mittlere obere Kurve:* primäre humane Osteoprogenitorzellen

mittlere Kurve: primäre humane Osteoblasten

mittlere untere Kurve: $\alpha_v\beta_3$ -Negativkontrollzellen M21L

untere Kurve: primäre Ratten-Osteoblasten

25 Abb.4: Adhäsion von Osteoblasten an mit Thiolpeptid 1-SMPP-Derivat (10 μM in der Beschichtungslösung) beschichteten Testoberflächen (s. Abb. 2)

x-Achse: Konzentration an gelöstem cyclo-RGDfK (ohne Molekülanker) im Anhaftungsmedium (μM),

y-Achse: Zell-Belegungsgrad (%);

obere Kurve: MC3T3 H1-Mäuse-Osteoblasten;

30 *mittlere Kurve:* primäre Human-Osteoblasten

untere Kurve: primäre Ratten-Osteoblasten.

Abb.5: Adhäsion von Osteoblasten an mit Thiolpeptid 1-SMPB-Derivat (10 μM in der Beschichtungslösung) beschichteten Testoberflächen (s. Abb. 2),

x-Achse: Zahl angesäter Zellen / cm^2

y-Achse: Zahl adherierter Zellen / cm^2

obere Kurve: primäre Ratten-Osteoblasten

mittlere obere Kurve: MC3T3 H1-Mäuse-Osteoblasten;

mittlere untere Kurve: primäre Human-Osteoblasten

untere Kurve: BSA-Negativbeschichtung.

Abb.6: Adhäsion von Osteoblasten an mit Thiolpeptid 1-SMPB-Derivat (10 μM in der Beschichtungslösung) beschichteten Testoberflächen (s. unter Abb. 2),

x-Achse: Zahl angesäter Zellen / cm^2

y-Achse: berechneter Flächenbedarf / Zellen (μm^2)

obere Kurve: primäre Human-Osteoblasten

mittlere Kurve: MC3T3 H1-Mäuse-Osteoblasten;

untere Kurve: primäre Ratten-Osteoblasten

Abb.7: Adhäsion von Osteoblasten an mit Thiolpeptid 1-SMPB-Derivat (10 μM in der Beschichtungslösung) beschichteten Testoberflächen (s. unter Abb. 2),

x-Achse: Zeit (min)

y-Achse: Zellbelegungsgrad (%)

obere Kurve: MC3T3 H1-Mäuse-Osteoblasten;

mittlere Kurve: primäre Human-Osteoblasten;

untere Kurve: primäre Ratten-Osteoplasten

Abb.8: Adhäsion von MC3T3 H1-Osteoblasten an mit verschiedenen RGD-Peptiden beschichteten Knochenzement-PMMA-Oberflächen:

x-Achse: RGD-Peptid Konzentration in der Beschichtungslösung (μM),

y-Achse: Zellbelegungsgrad (%)

obere Kurve: cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Derivat (Typ: iiii, Acrylat-peptid 3),

mittlere obere Kurve: cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Derivat (Typ: iib, Acrylatpeptid 2),

5 *mittlere untere Kurve:* cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Derivat (Typ:iiib, Acrylatpeptid 4),

untere Kurve: cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Derivat (Typ: iia, Acrylat-peptid 1),

10 Abb.9: Adhäsion von MC3T3 H1-Osteoblasten an mit verschiedenen RGD-Peptiden beschichteten, porösen PMMA / PHEMA-Oberflächen:
x-Achse: RGD-Peptid Konzentration in der Beschichtungslösung (μM),
y-Achse: Zellbelegungsgrad (%)

obere Kurve: cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Derivat (Typ: iiii, Acrylat-peptid 3),

15 *mittlere Kurve:* cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Derivat (Typ: iiib, Acrylatpeptid 4),

untere Kurve: cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Derivat (Typ: iib, Acrylat-peptid 2),

20 Abb.10: Adhäsion von MC3T3 H1-Osteoblasten an mit verschiedenen RGD-Peptiden beschichteten, porösen PMMA / Plex Y7H-Oberflächen:
x-Achse: RGD-Peptid Konzentration in der Beschichtungslösung (μM),
y-Achse: Zellbelegungsgrad (%)

obere Kurve: cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Derivat (Typ: iiii, Acrylat-peptid 3),

25 *mittlere Kurve:* cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Derivat (Typ: iiib, Acrylatpeptid 4),

untere Kurve: cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Derivat (Typ: iib, Acrylat-peptid 2),

30 Abb.11: Maximale Adhäsion von MC3T3 H1-Osteoblasten an mit verschiedenen RGD-Peptiden verschiedener Moleküllängen beschichteten Knochen-

zement-PMMA- bzw. Polystyrol-BSA-SMPB-Oberflächen:

x-Achse: RGD-Peptid-Moleküllängen (nm)

y-Achse: maximaler Belegungsgrad (%).

Abb. 12: Adhäsion von MC3T3 H1-Osteoblasten an mit RGD-Peptid cyclo-RGDfK NH-CO-Acrylat-Derivat (Typ iiiia, Acrylatpeptid 3)- beschichteten V4A-Edelstahloberflächen. Die Edelstahloberflächen sind ihrerseits zuvor mit verschiedenen Verfahren beschichtet worden.

x-Achse: RGD-Peptid-Konzentration in der Beschichtungslösung (μM)

y-Achse: Zellbelegungsgrad (%);

obere Kurve: Kevloc[®]-Beschichtung;

mittlere Kurve: Silicoater[®]-Beschichtung;

untere Kurve: Pigmentbeschichtung.

Abb. 13: Proliferation von MC3T3 H1-Osteoblasten an mit RGD-Peptid cyclo-RGDfK NH-CO-Acrylat-Derivat (Typ iiiia, Acrylatpeptid 3)- beschichteten Knochenzement-PMMA-Oberflächen.

x-Achse: Kultivierungsdauer (Tage),

y-Achse: Zellzahl;

oberer Kurve: 100 μM Peptid in der Beschichtungslösung;

mittlere obere Kurve: 1 μM Peptid in der Beschichtungslösung;

mittlere untere Kurve: 0,1 μM Peptid in der Beschichtungslösung;

untere Kurve: unbeschichtete Kontrolle.

Abb. 14: Adhäsion von MC3T3 H1-Osteoblasten und Thrombozyten an mit RGD-Peptid cyclo RGDfK NH-CO-Acrylat-Derivat (Typ: iiiia, - Acrylatpeptid 3) beschichteten Knochenzement-PMMA-Oberflächen.

x-Achse: Osteoblasten alleine und Thrombozyten alleine angesät auf Oberflächen mit verschiedenen Peptidkonzentrationen in der Beschichtungslösung von 100 μM , 10 μM und 1 μM .

y-Achse: Zellzahl (Absorption bei 405 nm).

Abb. 15: Adhäsion von MC3T3 H1-Osteoblasten und Thrombozyten an mit RGD-Peptid cyclo RGDfKG NH-CO-Acrylat-Derivat (Typ: iiiia, Acrylatpeptid 5) beschichteten Knochenzement-PMMA-Oberflächen.

5 x-Achse: Osteoblasten alleine und Thrombozyten alleine angesät auf Oberflächen mit verschiedenen Peptidkonzentrationen in der Beschichtungslösung von 100 μ M, 10 μ M und 1 μ M.

y-Achse: Zellzahl (Absorption bei 405 nm).

Abb. 16: Adhäsion von MC3T3 H1-Osteoblasten, Thrombozyten und einem Osteoblasten/Thrombozyten-Gemisch an mit RGD-Peptid cyclo RGDfKG NH-CO-Acrylat-Derivat (Typ: iiiia, Acrylatpeptid 3) beschichteten Knochenzement-PMMA-Oberflächen.

10 x-Achse: Osteoblasten alleine, Thrombozyten alleine und Osteoblasten / Thrombozyten-Gemisch angesät auf Oberflächen mit der Peptidkonzentration in der Beschichtungslösung von 100 μ M.

15 y-Achse: Zellzahl (Absorption bei 405 nm)

Abb. 17: Adhäsion von MC3T3 H1-Osteoblasten, Thrombozyten und einem Osteoblasten/Thrombozyten-Gemisch an mit RGD-Peptid cyclo RGDfKG NH-CO-Acrylat-Derivat (Typ: iiiia, Acrylatpeptid 5) beschichteten Knochenzement-PMMA-Oberflächen.

20 x-Achse: Osteoblasten alleine, Thrombozyten alleine und Osteoblasten / Thrombozyten-Gemisch angesät auf Oberflächen mit der Peptidkonzentration in der Beschichtungslösung von 100 μ M.

y-Achse: Zellzahl (Absorption bei 405 nm).

25 Die folgenden Beispiele erläutern weiter die Erfindung, ohne sie dabei zu beschränken.

Beispiel 1:

- (a) Die Synthese des cyclo-RGD-Peptids (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys) mit dem Anker Mercaptopropionsäure (\rightarrow cyclo-RGDfK NH-CO - Thiol-Derivat Typ: ia) wurde entsprechend dem Verfahren aus der DE 1 95 38 741 durchgeführt. Analog wurde die Synthese des in seiner biologischen Wirkung inaktiven entsprechenden cyclo-R~~B~~ADfK-Derivats sowie des cyclo-RGDfK-Derivats ohne Ankermolekül durchgeführt.
- (b) cyclo (R(Pbf)GD(tBu)fK(Z)) (Pbf = pentamethyl-benzofuran-sulfonyl; tBu = tert. Butyl) wurde durch Festphasenpeptidsynthese (Merrifield, Angew. Chem. 1985, 97: 801) und anschließender Cyclisierung (z. B. nach Zimmer et al., 1993, Liebigs Ann. Chem: 497) erhalten. Nach selektiver Abspaltung der Z-Schutzgruppe nach Standardmethodik kann die Lysinseitenkette durch Umsetzen von 0.1 mmol cyclo (R(Pbf)GD(tBu)fK) mit 0.2 mmol Bernsteinsäureanhydrid (bsa) in 5 ml Dimethylformamid zu cyclo (R(Pbf)GD(tBu)f[bsa-K]) verlängert werden.
- (c) Die Synthese des cyclo-RGD-Peptids (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys) mit dem Anker Mercaptoethylamidobernsteinsäure (\rightarrow cyclo-RGDfK NH-CO - Thiol-Derivat Typ: ib = cyclo(RGDf[Thiol-bsa-K]) wurde wie folgt, durchgeführt: 10 mmol Cysteaminhydrochlorid und eine äquimolare Menge (eq.) an Triphenylmethanol wurden bei 60°C in Eisessig gelöst und unter Rühren mit 1.1 eq. BF₃-Etherat versetzt. Nach 50 minütigem Rühren wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung neutralisiert und mit Essigester extrahiert. Das aus dem Extrakt verbleibende Öl wurde zur Überführung in das Hydrochlorid in tert.-Butanol gelöst, mit verdünnter Salzsäure auf pH = 2 gebracht und gefriergetrocknet. Ausbeute 99%. Der so erhaltene Baustein wird mit EDCI xHCl nach Standardmethoden an cyclo (R(Pbf)GD(tBu)f[bsa-K]) gekuppelt und die Seitenschutzgruppen werden abgespalten.
- (d) Die Synthese des cyclo-RGD-Peptids (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys) mit dem Anker Acrylamidohexansäure (\rightarrow cyclo-RGDfK NH-CO-Acryl-Derivat Typ: iia = cyclo(RGDf[Acryl-ahx-K]) wurde wie folgt, durchgeführt:

Das Acrylankersystem wurde separat synthetisiert und als Aktivester an die Peptidseitenkette gekuppelt. Dazu wurden 10 mmol 6-Aminohexansäure und 1.8 eq. Calciumhydroxid in Wasser suspendiert und bei 0° C 1,2 eq. Acrylsäurechlorid zugegeben. Unlösliches Calciumhydroxid wurde abfiltriert und das Filtrat mit konzentrierter Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Das ausgefallene Produkt wurde aus Essigester rekristallisiert. Ausbeute: 65%. 10 mmol der kristallinen 6-Acrylamidohexansäure wurden in 50 ml Dichlormethan suspendiert, mit 1 eq. N-Hydroxysuccinimid versetzt und bei 0°C 1.2 eq. EDCI·HCl zugegeben. Nach einstündigem Rühren wurde die Reaktion durch Zusatz von 10 µl Eisessig gestoppt. Es wurde mehrfach mit kalter, gesättigter Natriumcarbonatlösung und mit Wasser extrahiert und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Ausbeute: 52%. Der nun vorliegende Aktivester wurde in DMF an cyclo(R(Pbf)GD(tBu)fK) angekuppelt und die Seitenkettenschutzgruppen nach Standardvorschriften abgespalten.

(e) Die Synthese des cyclo-RGD-Peptids (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys) mit dem Anker Acrylamidohexansäure-amidohexansäure (→ cyclo-RGDfK NH-CO-Acryl-Derivat Typ: iib = cyclo(RGDf[Acryl-ahx-ahx-K]) wurde wie folgt, durchgeführt: Zur Synthese des Acrylankersystems werden 10 mmol Amino-hexansäure in wässrigem Natriumphosphatpuffer (pH 8) gelöst und auf 0°C gekühlt. 2 mmol Acrylamidohexansäureaktivester (siehe (d)) wurden in Ethanol/CHCl₃ gelöst und langsam zugegeben. Der pH-Wert wurde mit verdünnter NaOH konstant auf 8 gehalten. Nach Abdestillieren der organischen Lösungsmittel wurde die wässrige Phase mit konzentrierter Salzsäure auf pH 2.6 angesäuert und der ausfallende Feststoff abfiltriert, mit Wasser gewaschen und über Phosphorpentoxid getrocknet. Ausbeute: 70%. Das nun vorliegende Acrylankersystem wird mit EDCI·HCl nach an sich bekannten Methoden an die Peptidseitenkette gekuppelt und die Schutzgruppen abgespalten.

(f) Die Synthese des cyclo-RGD-Peptids (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys) mit dem Anker Acrylamidohexansäure-amido-triethylenglycolsäure (→ cyclo-RGDfK NH-CO-Acryl-Derivat Typ: iiii = cyclo(RGDf[Acryl-ahx-tEG-K]) wurde wie folgt, durchgeführt:

Das Acrylankersystem wurde durch Festphasenpeptidsynthese (siehe oben) dargestellt. Als letzter Baustein wurde die Acrylamidohexansäure (siehe oben) gekuppelt. Ausbeute: 97 %. Das nun vorliegende Acrylankersystem wird mit EDCI·HCl nach an sich bekannten Methoden an die Peptidseitenkette gekuppelt und die Schutzgruppen abgespalten.

- (g) Die Synthese des cyclo-RGD-Peptids (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys) mit dem Anker Acrylamidohexansäure-amidotriethylenglycolsäure-amidotriethylen-glycolsäure (→ cyclo-RGDfK NH-CO-Acryl-Derivat Typ: iiib = cyclo (RGDf [Acryl-ahx-tEG-tEGK]) erfolgte analog zu (f). Ausbeute: 85%.
- (i) Die Synthese des cyclo-RGD-Peptids (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys-Gly) mit dem Anker Acrylamidohexansäure-amidotriethylenglycolsäure (→ cyclo-RGDfK NH-CO-Acryl-Derivat Typ: iia = cyclo (RGDf [Acryl-ahx-tEG-KG]) erfolgte analog zu (f). Ausbeute: 81%.

Beispiel 2:

In Anlehnung an die etablierten Verfahren von Singer et al., 1987, J. Cell. Biol. 104:573, bzw. von Ruoslahti et al. (1982, Methods. Enzymol., 82:803-831) wurde die kovalente Kopplung der erfindungsgemäßen Peptide mit Sulfo-Succinimidyl-4 (p-Maleimidophenyl)-Butyrat (Sulfo-SMPB) an mit Rinderserumalbumin (BSA) vorbeschichteten Kulturoberflächen aus Polystyrol vollzogen.

Hierzu wurden 48-Wells (Costar, „non-tissue culture treated“, Art. Nr. 3547) mit je 250 µl PBS (phosphate buffered saline), pH = 8,3, 2% BSA, pro Vertiefung über-schichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, um eine auf dem Polystyrol befindliche BSA-Schicht zu generieren. Anschließend wurde mit 250 µl PBS, pH = 8,3 pro Vertiefung gewaschen und mit je 250 µl einer Lösung mit 100 µg/ml SMPB in PBS, pH 8,3, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein drei-maliges Waschen der Wells mit je 250 µl PBS, pH 8,3. Zur Herstellung der Beschichtungslösungen wurde das entsprechende Thiol-RGD-Peptid in folgenden Endkonzentrationen in PBS, pH 8,3, angesetzt: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10

5 μM , 100 μM , und 1 mM. Nach Zugabe von je 250 μl Beschichtungslösung/Well wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit PBS, pH 8,3, gewaschen. Durch Zugabe von je 250 μl einer 5%igen BSA-Lösung in PBS, pH 7,4, anschließender Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur und Waschen mit PBS, pH 7,4, wurden unspezifische Zellbindestellen blockiert. Als Beschich-
10 tungs-Negativ-Kontrollen fungierten Polystyroloberflächen, die ab der Beschichtung mit einer 5%igen BSA-Lösung identisch wie die Positivproben behandelt wurden. Anschließend wurde die Adhäsion von vier Zellkulturen, die aus drei unterschiedli-
10 chen Spezies gewonnen wurden, an die oben genannten mit RGD-Peptid beschichte-
ten Oberflächen untersucht:

- primäre humane Osteoblasten aus der Femurkopfspongiosa adulter Patienten (Siggelkow et al., 1997, Bone 20: P231);
- primäre humane Osteoprogenitorzellen aus dem Knochenmark adulter Patienten (Vilamitjana-Amedee et al., 1993, In vitro Cell Dev. Biol. 29: 699);
- 15 - primäre Osteoblasten aus der Kalvaria neonataler Ratten, deren Präparation und Kultivierung in Anlehnung an die Methode von Yagiela und Woodbury (1977, The Anatomical Record, 188:287-305) erfolgte;
- Osteoblasten-Zelllinie MC3T3 H1, gewonnen aus der Kalvaria neonataler Mäuse (Heermeier et al., 1995, Cells and Materials, 5:309-321) und
- 20 - Humane Melanom-Zell-Linie M21L als $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ -Integrin Negativkon-
trolle.

Bevor diese Zell-Spezies zu den Adhäsionsexperimenten eingesetzt wurden, wurde deren Integrin-Expression mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen die $\alpha_v\beta_3$ - bzw. $\alpha_v\beta_5$ -Rezeptoren sowie gegen die Integrin-Untereinheiten α_v , β_3 und β_5 anhand eines Becton-Dickenson Fluorescence Activated Cell
25 Sorter (FACS) verifiziert. Es zeigte sich dabei eine starke Expression der besagten Integrine (Abb. 1).

Die beschriebenen Zell-Spezies wurden mit einer Ansaatdichte von 48.000 Zellen/ cm^2 in, wie oben beschrieben, mit RGD-Peptid beschichteteten Costar-48-Well, 30 angesät und anschließend 1 Stunde bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO_2 inku-

biert. Anschließend wurden während des Experiments nicht adhierte Zellen zweimal mit PBS, pH 7,4, abgewaschen.

Die Quantifizierung der adhierten Zellen erfolgte indirekt über die Aktivitätsbestimmung des zellulären Enzyms N-Acetyl-Hexosaminidase unter Verwendung einer entsprechenden Standardkurve nach der Methode von Landegren (1984, J. Immunol. Methods, 67:379-388).

Die Beschichtung von BSA-vorbehandelten Polystyrol-Zellkulturoberflächen mit den $\alpha_v\beta_3$ - bzw. $\alpha_v\beta_5$ -selektiven Thiolpeptiden 1-, 2- (Sulfo-SMPB)-Derivaten führt zu einer starken und dosisabhängigen Stimulierung der Adhäsion von kultivierten Maus MC3T3 H1-Osteoblasten (s. Abb. 2). Im Gegensatz hierzu hat die biologisch inaktive Thiolpeptid-Kontrolle keinen signifikanten Effekt, wodurch die hohe Selektivität und die hohe Spezifität der Integrin-RGD-Peptid Wechselwirkung gezeigt wird. Auch das weniger $\alpha_v\beta_3$ -/ $\alpha_v\beta_5$ -selektive Thiolpeptid 3 -(Sulfo-SMPB) (cyclo-RGDvE-aminocystein-amidohexansäure: Del-

15 forge et al., 1996, Anal. Biochem. 242, 180) zeigt einen deutlich schwächeren Effekt als die entsprechenden Thiolpeptid 1 und 2 - derivate.

Das Bindungsverhalten der unterschiedlichen Zell-Spezies an mit Thiolpeptid 1-(Sulfo-SMPB)-Derivat oder Thiolpeptid 2-(Sulfo-SMPB)-Derivat beschichtete, BSA-vorbehandelte Polystyrol-Oberflächen entspricht einer Titrationskurve mit einer maximalen Adsorptionsrate von ca. 70% (primäre Ratten-Osteoblasten), ca. 80% (primäre humane Osteoblasten und primäre humane Osteoprogenitorzellen) und ca. 90-100% (MC3T3 H1- Maus-Osteoblasten) der angesäten Zellen sowie einer halbmaximalen Zellanbindung bei einer RGD-Peptid-Konzentration in der Beschichtungslösung von 50 - 1000 nM (Abb.3). $\alpha_v\beta_3$ - / $\alpha_v\beta_5$ - Negativ-

20 kontrollzellen (M21L) zeigen im Gegensatz hierzu keine signifikante Zell-Adhäsion

Die beschriebenen Zell-Adsorptionsraten sind gegenüber mit 5% BSA-beschichteten Oberflächen, welche zu keiner signifikanten Zell-Adhäsion für alle eingesetzten Osteoblasten Kulturen führen, ca. 20-40 fach erhöht.

Das ähnliche Verhalten der genannten Osteoblasten-Kulturen belegt, daß die adhäsionsstimulierenden Effekte osteoblastenspezifisch jedoch speziesunabhängig sind.

30

Die Bindung der oben genannten Osteoblasten-Zellkulturen an mit Thiolpeptid 1-Sulfo-SMPB-Derivat beschichteten BSA-vorbehandelten Polystyroloberflächen kann durch Zugabe von gelöstem zyklischen RGDfK im Anhaftungsmedium vollständig inhibiert werden (Abb. 4). Dieses Ergebnis beweist, daß die beobachteten
5 Zelladhäsionsphänomene alleine durch RGD-Peptide vermittelt werden.

Die Abhängigkeit der Zelladhäsion von primären humanen Osteoblasten bzw. von MC3T3 H1-Zellen auf den genannten Thiolpeptid 1,2 (Sulfo-SMPB) beschichteten, BSA-vorbehandelten Polystyroloberflächen von der Anzahl angesäter Zellen liefert eine Sättigungskurve (Abb. 5). Auf der BSA-Negativbeschichtung dagegen ist keine
10 signifikante Zellanhaftung zu erkennen. Die bei maximaler Zellaussaatdichte berechnete durchschnittliche Fläche pro adherierte Zelle von ca. 200 bis 500 μm^2 liefert auf dieser Oberfläche einen durchschnittlichen Zell-Zell-Abstand von etwa 15 bis 25 μm (Abb. 6). Da der Osteoblasten-Zelldurchmesser ca. 10 bis 15 μm beträgt, wird deutlich, daß die Peptidbeschichtung Zellanhaftungsstellen in solcher Zahl be-
15 reitstellt, daß eine mit Osteoblasten dicht belegte Oberfläche erzielt werden kann, bei der die Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander angeordnet sind. Der zeitliche Verlauf des Zellanhaftungsprozesses auf der genannten Oberfläche zeigt eine schnelle Adhäsion der Zellen, die, je nach Zelltyp, nach etwa 45 bis 60 Minuten abgeschlossen ist (Abb. 7). Zell-Linien (z.B. MC3T3 H1) zeigen dabei eine
20 schnellere Anhaftungskinetik als primäre Zellkulturen (Human, Ratte). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Thiolpeptid-Derivaten sind bei diesen Versuchen nicht erkennbar.

Beispiel 3:

25

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Ankermoleküllängen und damit des Abstandes zwischen der zellerkennenden RGD-Sequenz und der Materialoberfläche auf das Ausmaß der Osteoblasten-Adhäsion wurden vier verschiedene Acrylat-RGD-Peptide (cyclo-RGDfK NH-CO - Acrylat-Derivat (Typ: iia, iib, iiaa, iiib), mit
30 unterschiedlichen molekularen Abstandshalterlängen hergestellt.

Die Synthesen der cyclo-RGD-Peptide wurden, wie in Beispiel 1 angegeben oder entsprechend den Verfahren von Pless et al., 1983, J. Biol. Chem. 258: 2340-2349 bzw. von Gurrath et al., 1992, Eur. J. Biochem. 210: 911-921 durchgeführt.

Die entsprechenden Ankerlängen dieser Peptide betragen etwa 2,6 nm (Acrylatpeptid 1, Typ iia), 3,5 nm (Acrylatpeptid 2, Typ iib), 3,7 nm (Acrylatpeptid 3, Typ iiaa) bzw. 4,2 nm (Acrylatpeptid 4, Typ iibb).

Zur kovalenten Kopplung dieser Peptide an auspolymerisierte PMMA (Polymethylmethacrylat) -Oberflächen wurden entsprechende Formkörper unterschiedlicher Porosität (Durchmesser: 10 mm; Höhe: 2 mm) aus drei verschiedenen PMMA-Komponenten hergestellt.

- Knochenzement auf PMMA-Basis (Fa. Merck KGaA, Germany, Zul. Nr. 5181.00.00) entsprechend der Produktbeschreibung (40 g Pulver + 20 ml Flüssigkeit).
- 10 g PMMA/PHEMA (Polyhydroxyethylmethacrylat)-Granulat, Partikelgröße 0,5-0,6 mm (Fa. Biomet) wurden mit 1,3 ml einer HEMA-Lösung (68,6% HEMA, 29,4% TEGMA, [Triethylenglykoldimethacrylat], 2% tBPB, [tert. Butylperoxybenzoat]) vermischt und dadurch zu einem porösen Trägermaterial verklebt.
- 10 g PMMA-Granulat (Plex Y7H, Röhm, Germany), Kornfraktion 0,7-2 mm wurden mit 1,5 ml einer Methylmethacrylat (MMA)-Lösung (68,6% MMA, 29,4% TEGMA 2% tBPB) vermischt und dadurch zu einem porösen Trägermaterial verklebt.

Zur kovalenten Kopplung der Acrylatpeptide an die vorpolymerisierten PMMA-Formkörper wurden Stammlösungen der Acrylatpeptide 1, 2, 3 und 4 in einer Endkonzentration von jeweils 100 μ M in DMSO/0,2% Campherchinon (w/v) hergestellt. Anschließend wurden durch Verdünnung mit Isopropanol/0,2% Campherchinon (w/v) Konzentrationsreihen mit Peptidendkonzentrationen von jeweils 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M und 10 μ M hergestellt. Die Formkörper wurden 2 Stunden bei Tageslicht und Raumtemperatur inkubiert und anschließend in trocke-

nem Zustand bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurden die Proben zur Entfernung ungebundener Peptide dreimal mit PBS, pH 7,4, gewaschen und über Nacht in PBS, pH 7,4, bei 4°C gelagert.

5 Durch Zugabe von je 250 µl/Formkörper einer 5%igen BSA-Lösung in PBS, pH 7,4, und anschließender Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur und einmaligem Waschen mit PBS, pH 7,4, wurden unspezifische Zellbindestellen blockiert.

Als Negativkontrollen fungieren PMMA-Formkörper, die anstelle mit den Peptidlösungen mit einer Lösung aus Isopropanol/0,2% Campherchinon (w/v) behandelt wurden.

10

Im Anschluß wurde die Adhäsion von Osteoblasten der MC3T3 H1-Linie, gewonnen aus der Kalvaria neonataler Mäuse (Heermeier et al., 1995, Cells and Materials 5: 309-321) an o. b. peptidbeschichtete Oberflächen untersucht.

15 Die MC3T3 H1-Osteoblasten wurden mit einer Ansaatdichte von 48.000 Zellen/cm² auf, wie oben beschrieben, in Costar-48-Wells befindlichen, mit RGD-Peptid beschichteten, PMMA-Formkörpern angesät und anschließend 1 Stunde bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden während des Experiments nicht adherierte Zellen zweimal mit PBS, pH 7,4, abgewaschen.

20 Die Quantifizierung der adherierten Zellen erfolgte indirekt über die Aktivitätsbestimmung des zellulären Enzyms N-Acetyl-Hexosaminidase unter Verwendung einer entsprechenden Standardkurve nach der Methode von Landegren (1984, J. Immunol. Methods, 67: 379-388).

25 Das Bindungsverhalten der MC3T3 H1-Osteoblasten an mit genannten Acrylat-RGD-Peptiden 1 (Typ iia), 2 (Typ iib), 3 (Typ iiaa) und 4 (Typ iiib) beschichteten, unterschiedlichen PMMA-Formkörpern entspricht jeweils einer Titrationskurve. Die maximalen Adsorptionsraten betragen ca. 20% für Acrylatpeptid 1 und ca. 80-100% für die Acrylatpeptide 2, 3 und 4. Die halbmaximalen Zellanbindungen erfolgen bei einer RGD-Peptidkonzentration in der Beschichtungslösung von ca. 1-10000 nM für
30 die Acrylatpeptide 2, 3 und 4.

Die beschriebenen Zell-Adsorptionsraten auf RGD-Peptid-beschichteten Knochenzement-Formkörpern sind gegenüber unbeschichteten Oberflächen ca. 1,5 fach (Acrylatpeptid 1) und ca. 5-15 fach (Acrylatpeptide 2, 3 und 4) erhöht (Abb. 8).

5 Die beschriebenen Zell-Adsorptionsraten auf RGD-Peptid-beschichteten porösen PMMA/PHEMA-Granulat-Formkörpern sind gegenüber unbeschichteten Oberflächen 2-5 fach (Acrylatpeptide 2, 3 und 4) erhöht (Abb. 9).

Die beschriebenen Zell-Adsorptionsraten auf RGD-Peptid-beschichteten porösen Plex Y7H-Granulat-Formkörpern sind gegenüber unbeschichteten Oberflächen 2-3 fach (Acrylatpeptide 2, 3 und 4) erhöht (Abb. 10).

10 Für PMMA/PHEMA- bzw. für PMMA-Plex Y7H-Proben werden sowohl eine größere Schwankungsbreite der Zelladhäsionswerte als auch eine stärkere Anhaftung der Osteoblasten an unbeschichtete Kontrollproben bei gleichbleibenden maximalen Anhaftungsraten an RGD-Peptid-beschichtete Proben beobachtet als für PMMA-Knochenzementformkörper.

15

Für die Acrylatpeptide 2, 3 und 4 werden sowohl im Vergleich untereinander als auch im Vergleich zu den auf der Test-BSA-Kontrolle beschichteten Thiolpeptiden 1 und 2 sehr ähnliche Stimulierungen der Zell-Adhäsion beobachtet, das kürzeste Peptid, Acrylatpeptid 1, ist dagegen fast inaktiv. Daraus kann geschlossen werden, daß ein kritischer Mindestabstand zwischen RGD-Zellerkennungssequenz und der Materialoberfläche von ca. 2,5-3,5 nm erforderlich ist, um eine sterisch erfolgreiche Zell-Adhäsion vollziehen zu können (Abb. 11).

20

Die höhere Aktivität von Acrylatpeptid 3 auf dem Knochenzement-PMMA-Träger weist auf eine für die Zellanhaftung optimale Molekülstruktur hinsichtlich sowohl der Moleküllänge als ggf. auch der Hydrophilie/Hydrophobie-Verteilung bzw. -Verhältnis im Abstandshalter hin.

25

30

Beispiel 4:

Zur Testung der Zelladhäsion von Osteoblasten an peptidbeschichtete Metalloberflächen wurden V4A-Edelstahlformkörper (7x7x1 mm³) mit drei verschiedenen Beschichtungsvarianten versehen und jeweils anschließend ihrerseits mit RGD-Peptiden beschichtet. Dazu wurden vorerst die Edelstahlformkörper zwecks Reinigung 15 min. bei 60°C im Ultraschallbad inkubiert, mit VE-Wasser gespült, 30 min. in Aceton inkubiert, nochmals mit VE-Wasser gespült und zur Trocknung 24 Stunden bei 60°C inkubiert.

10

Anschließend wurden die Edelstahlplättchen mittels dreier Varianten beschichtet:

a. Kevloc[®]-Verfahren (Fa. Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany):

Die Lösung Kevloc[®]-Primer wurde dünn aufgebracht und 3 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung Kevloc[®]-Bond ebenfalls dünn aufgebracht und 20 min. bei 180°C im Brennofen aktiviert.

15

Da diese Beschichtungsvariante direkt freie Acrylatreste auf der Metalloberfläche bereitstellt, konnte anschließend das Acrylatpeptid 3, Typ iiiia, direkt kovalent gekoppelt werden, so wie dies im Beispiel 3 für auspolymerisierten PMMA-Knochenzement beschrieben wurde.

b. Silicoater[®]-Verfahren (Fa. Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany):

20

Die Lösung Siliseal[®] wurde dünn aufgebracht und 5 min. bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die Lösung Sililink ebenfalls dünn aufgebracht und 3 min. bei 320°C im Brennofen aktiviert.

Zur Bereitstellung von Acrylatresten auf den beschichteten Metalloberflächen wurden die vorbehandelten Edelstahlformkörper in 75°C erwärmtes VE-Wasser, mit NaOH auf pH ca. 8,00 eingestellt und getaucht. Anschließend wurde über einen Zeitraum von einer Stunde eine 1%ige 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan-Lösung (Fa. Hüls AG, Germany) unter Rühren zudosiert, bis ein pH-Wert von ca. 6,50 erreicht wurde. Anschließend wurde eine Stunde bei 75°C nachgerührt, der pH-Wert lag zu diesem Zeitpunkt bei ca. 6,35.

25
30

Die Anbindung von Acrylatpeptid 3, Typ iiiia, erfolgte wie im Beispiel 3 für auspolymerisierten PMMA-Knochenzement beschrieben.

c. Pigmentbeschichtung (Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Germany):

Diese Beschichtungsvariante erfolgte entsprechend eines Silanisierungsverfahrens, das in der DE-OS 4321005 beschrieben ist, und welches ursprünglich die technische Lehre der Beschichtung von Perlglanzpigmenten für Wasserlacksysteme für Metalle und Kunststoffe in der Automobil- und Kunststoffindustrie darlegt.

Hierzu wurden die Edelstahlformkörper in 75°C erwärmtes VE-Wasser, mit NaOH auf pH ca. 8,00 eingestellt, und es wurde über einen Zeitraum von zwei Stunden eine AlCl₃-Lösung unter Rühren zudosiert. Anschließend wurde eine 5%ige Natronwasserglas-Lösung ebenfalls unter Rühren über zwei Stunden zudosiert. Im folgenden wurde innerhalb einer Stunde eine 1%ige 3-

Methacryloxypropyltrimethoxysilan-Lösung (Fa. Hüls AG, Germany) unter Rühren zudosiert. Anschließend wurde eine Stunde bei 75°C nachgerührt, der pH-Wert lag zu diesem Zeitpunkt bei ca. 6,40.

Die Anbindung von Acrylatpeptid 3, Typ iiiia, erfolgte wie im Beispiel 3 für auspolymerisierten PMMA-Knochenzement beschrieben.

Nachdem die Edelstahlformkörper mittels dreier verschiedener Verfahren mit Acrylatpeptid 3, Typ iiiia, beschichtet worden waren, wurde die Adhäsion von Osteoblasten der Linie MC3T3 H1 untersucht. Hierzu wurde wie in Beispiel 3 beschrieben verfahren.

Das Bindungsverhalten der MC3T3 H1-Osteoblasten an mit genanntem Acrylatpeptid 3 beschichteten, mit drei unterschiedlichen Verfahren vorbehandelten V4A-Edelstahlformkörper entspricht jeweils einer Titrationskurve (Abb. 12).

Die maximalen Adhäsionsraten betragen ca. 60% für die Pigmentbeschichtung und ca. 80% für Kevloc®- bzw. Silicoater®-Verfahren. Die halbmaximalen Zellanbindungen erfolgen bei einer RGD-Peptidkonzentration in der Beschichtungslösung von ca. 1-100 nM für alle drei Beschichtungsvarianten. Die beschriebenen Zell-

Adsorptionsraten auf RGD-Peptid-beschichteten Edelstahlformkörpern sind gegenüber unbeschichteten Kontrollen ca. 3-8 fach erhöht.

Für Kevloc[®]- bzw. Silicoater[®]-Verfahren wurden jeweils zusätzlich Beschichtungen unter Verwendung lediglich einer Beschichtungslösung hergestellt (Kevloc[®]-Primer alleine, Kevloc[®]-Bond alleine, Siliseal[®] alleine, Sililink[®] alleine). Es wurden dabei
5 keine signifikanten Unterschiede in der Zelladhäsion im Vergleich zu den jeweiligen Doppelbeschichtungen (Kevloc[®]-Primer/-Bond, Siliseal[®]/Sililink[®]) beobachtet.

Beispiel 5:

10

Zur ergänzenden Untersuchung nicht nur der Osteoblasten-Adhäsion, sondern auch deren Proliferation auf RGD-Peptid-beschichteten Oberflächen wurde wie folgt vorgegangen:

Zur kovalenten Kopplung von Acrylatpeptid 3, Typ iiii, an auspolymersierte PMMA-Knochenzementformkörper wurde ein Beschichtungsverfahren gewählt, das
15 im Beispiel 3 beschrieben wurde.

Anschließend wurden MC3T3 H1-Maus-Osteoblasten wie ebenfalls im Beispiel 3 beschrieben an diese RGD-Peptid-beschichteten Knochenzementformkörper adhe-
riert, allerdings mit zwei Unterschieden: es wurden 12.000 Zellen/cm² anstelle von
20 48.000 Zellen/cm² angesät und die Adhäsionszeit betrug zwei Stunden anstelle von einer Stunde. Außerdem wurden nur drei verschiedenen Peptidkonzentrationen in der Beschichtungslösung untersucht: 0,01 µM, 1 µM und 100 µM.

Nach dem Abwaschen nicht adhärenter Zellen wurden die MC3T3 H1-Osteoblasten in serumhaltigem (10%) Kulturmedium über einen Zeitraum von 15 Tagen bei 37°C
25 unter 95% Luftfeuchte und 5% CO₂ kultiviert. Dabei wurde zweimal pro Woche das Medium gewechselt und nach 1, 2, 3, 4, 5, 10 und 15 Tagen die Zellzahl mittels des WST-1-Tests von Boehringer Mannheim, Germany, bestimmt. Hierbei zeigte sich jeweils ein typischer exponentieller Verlauf der Zellproliferation der kultivierten Osteoblasten (Abb. 13). Die maximal erreichte Zellzahl war direkt von der RGD-
30 Peptidkonzentration in der Beschichtungslösung abhängig. So wurden nach 15 Kul-

tivierungstagen pro cm^2 ca. 1.000.000 Zellen (100 μM Peptid), ca. 550.000 Zellen (1 μM Peptid), ca. 300.000 Zellen (0,01 μM Peptid) bzw. ca. 230.000 Zellen (Kontrolle ohne Peptid) erreicht. Bei der höchsten Peptidkonzentration von 100 μM wurde somit eine etwa 4-5 fache Steigerung der Zellproliferation im Vergleich zu unbeschichteten Proben beobachtet.

Beispiel 6:

Als Modell für die Materialbeschichtung mit RGD-Peptiden unterschiedlicher Zellselektivität zur Gewinnung von Implantaten mit lokal differenzierten bioaktiven Beschichtungsmustern, welche die Adhäsion verschiedener Zell-Species stimulieren sollen, dienten auspolymerisierte PMMA-Knochenzementformkörper. An diese wurden zwei RGD-Peptide unterschiedlicher Zell-Selektivität kovalent gekoppelt. Dabei wurden Acrylatpeptid 3, Typ $\alpha_5\beta_1$, mit einer Selektivität für $\alpha_5\beta_1$ - $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-tragende Osteoblasten, und Acrylatpeptid 5, Typ $\alpha_{IIb}\beta_3$, mit einer Selektivität für $\alpha_{IIb}\beta_3$ -positive Thrombozyten, wie für Beispiel 3 beschrieben an die PMMA-Formkörper gebunden.

a. Im ersten Teilversuch wurden PMMA-Formkörper mit den Acrylatpeptiden 3 und 5 in Konzentrationen in der Beschichtungslösung von jeweils 100 μM , 10 μM und 1 μM beschichtet. Anschließend wurden diese RGD-Peptid-beschichteten Materialien parallel mit Osteoblasten und Thrombozyten beimpft und deren Zelladhäsion bestimmt.

Sowohl auf Acrylatpeptid 3- als auch auf Acrylatpeptid 5-beschichteten PMMA-Formkörpern wurden jeweils parallel MC3T3 H1-Osteoblasten (350.000 Zellen/ cm^2) bzw. humane Thrombozyten (50 Mio. Zellen/ cm^2) angesät und deren Zelladhäsion, wie in Beispiel 3 beschrieben, bestimmt.

Humane Thrombozyten wurden in Anlehnung an das Verfahren von Shattil und Brass (J. Biol. Chem. 262:992-1000, 1987) präpariert.

Mit diesem Experiment konnte die Zellselektivität der beiden RGD-Peptide demonstriert werden.

Auf Acrylatpeptid 3 ($\alpha_v\beta_3$ -/ $\alpha_v\beta_5$ -selektiv)-beschichteten PMMA-Formkörpern adherierten bevorzugt $\alpha_v\beta_3$ -/ $\alpha_v\beta_5$ -positive Osteoblasten im Vergleich zu $\alpha_v\beta_3$ -/ $\alpha_v\beta_5$ -negativen Thrombozyten (Abb. 14). Dabei wurden für Osteoblasten kalkulierte Abs (405 nm) von ca. 6,0 (für 100 μ M Peptid in der Beschichtungslösung), ca. 2,0 (für 10 μ M Peptid) bzw. ca. 1,8 (für 1 μ M Peptid) gefunden. Für Thrombozyten dagegen wurden signifikant niedrigere Zelladhäsionswerte von ca. 3,0 Abs (für 100 μ M Peptid in der Beschichtungslösung), ca. 1,5 Abs (für 10 μ M Peptid) bzw. ca. 0,2 Abs (für 1 μ M Peptid) gefunden. Auf Acrylatpeptid 5 ($\alpha_{IIb}\beta_3$ -selektiv)-beschichteten PMMA-Formkörpern dagegen wurde ein umgekehrter Effekt gefunden. Hier adherierten bevorzugt $\alpha_{IIb}\beta_3$ -positive Thrombozyten im Vergleich zu $\alpha_{IIb}\beta_3$ -negativen Osteoblasten (Abb. 15). Dabei wurden für Thrombozyten kalkulierte Abs (405 nm) von ca. 4,0 (für 100 μ M Peptid in der Beschichtungslösung), ca. 0,5 (für 10 μ M Peptid) bzw. ca. 0,2 (für 1 μ M Peptid) gefunden. Für Osteoblasten dagegen wurden signifikant niedrigere Zelladhäsionswerte von ca. 1,5 Abs (für 100 μ M Peptid in der Beschichtungslösung), ca. 1,0 Abs (für 10 μ M Peptid) bzw. ca. 0,2 Abs (für 1 μ M Peptid) gefunden.

b. Im zweiten Teilversuch wurden ebenfalls PMMA-Formkörper mit den Acrylatpeptiden 3 und 5 beschichtet, allerdings in nur einer Konzentration in der Beschichtungslösung von jeweils 100 μ M. Anschließend wurden diese RGD-Peptid-beschichteten Materialien parallel mit Osteoblasten, Thrombozyten bzw. einem Osteoblasten/Thrombozyten-Gemisch beimpft und deren Zelladhäsion bestimmt. Sowohl auf Acrylatpeptid 3- als auch auf Acrylatpeptid 5-beschichteten PMMA-Formkörpern wurden jeweils parallel MC3T3 H1-Osteoblasten (350.000 Zellen/ cm^2), humane Thrombozyten (50 Mio. Zellen/ cm^2) bzw. ein Zell-Gemisch (350.000 Osteoblasten/ cm^2 bzw. 50 Mio. Thrombozyten/ cm^2) angesät und deren Zelladhäsion, wie in Beispiel 3 beschrieben, bestimmt.

Auf Acrylatpeptid 3-beschichteten PMMA-Formkörpern adherierten bevorzugt $\alpha_v\beta_3$ -/ $\alpha_v\beta_5$ -positive Osteoblasten (ca. 6,0 Abs) im Vergleich zu $\alpha_v\beta_3$ -/ $\alpha_v\beta_5$ -negativen Thrombozyten (ca. 3,0 Abs) (Abb. 16). Wurden beide Zell-Species als Gemisch angesät, wurde ein Ergebnis erhalten, das demjenigen von
5 Osteoblasten alleine entspricht (ca. 6,5 Abs).

Auf Acrylatpeptid 5 ($\alpha_{IIb}\beta_3$ -selektiv)-beschichteten PMMA-Formkörpern dagegen wurde ein umgekehrter Effekt gefunden. Hier adherierten bevorzugt $\alpha_{IIb}\beta_3$ -positive Thrombozyten (ca. 4,0 Abs) im Vergleich zu $\alpha_{IIb}\beta_3$ -negativen
10 Osteoblasten (ca. 1,5 Abs) (Abb. 17). Wurden beide Zell-Species als Gemisch angesät, wurde ein Ergebnis erhalten, das etwa der Summe der Einzelwerte für Thrombozyten und Osteoblasten entspricht (ca. 6,5 Abs).

Diese Ergebnisse belegen, daß die Beschichtungen von Implantatoberflächen mit
15 verschiedenen zellselektiven RGD-Peptiden zur Generation von Implantaten genutzt werden können, die die bevorzugte Adhäsion ausgewählter Zell-Species vermitteln. Dabei zeigt der Vergleich zwischen Osteoblasten und Thrombozyten, daß
- die Oberflächenbeschichtung mit integrin-selektiven RGD-Peptiden die Adhäsion derjenigen Zell-Species, die über eine komplementäre Integrin-Ausstattung verfügen, gegenüber Zellen, die diese speziellen Integrine nicht oder nur in geringem
20 Umfang besitzen, deutlich stimuliert werden kann.
- dieser Effekt auch bei Verwendung von Zellgemischen, was dem in vivo-Zustand wesentlich näher kommt, erhalten bleibt.

25

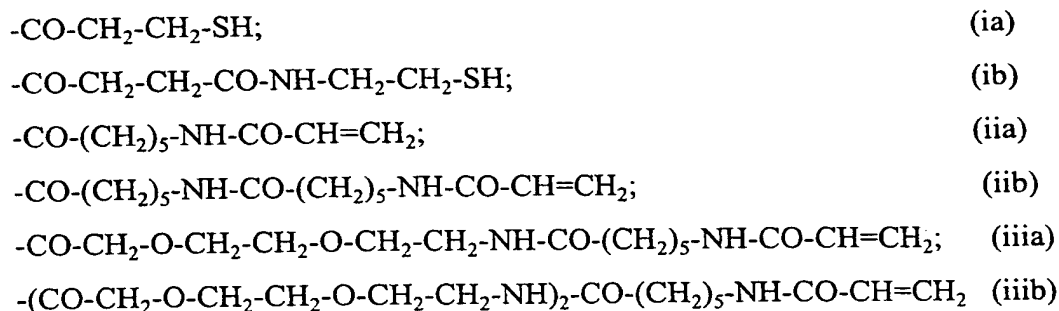
30

Patentansprüche

1. Implantat, geeignet für unterschiedliche menschliche und tierische Organe, bestehend im wesentlichen aus einer Trägermatrix und einer diese Matrix umhüllenden Peptid-Beschichtung, die zur zielgerichteten Adhäsionsstimulierung von menschlichen oder tierischen Körperzellen gleichartige oder verschiedene Peptide enthält, welche Sequenzen aufweisen, die Bindungsstellen auf den für die Adhäsion verantwortlichen Integrin-Rezeptoren auf humanen oder tierischen Zellen erkennen, wobei die Trägermatrix reaktive bindungsfähige Gruppen an ihrer Oberfläche aufweist, die dazu befähigt sind mit entsprechenden funktionellen reaktiven Gruppen besagter Peptidschicht eine stabile kovalente Bindung einzugehen, dadurch gekennzeichnet, daß besagte Peptide so auf der Oberfläche des Implantats angeordnet sind, daß sie aufgrund ihrer entsprechend unterschiedlichen strukturbedingten, zelladhäsionsstimulierenden Aktivität spezifisch dem natürlichen unterschiedlichen komplementären Integrinmuster der in der jeweiligen Region an sie angrenzenden Gewebezellen entsprechen, in die das Implantat eingebracht werden soll, wodurch ein lokal differenziertes, selektives, bioaktives Beschichtungsmuster der Implantatoberfläche vorliegt.
2. Implantat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die besagten Peptide mit Hilfe von Ankermolekülen auf der Oberfläche des Implantats fixiert sind.
3. Implantat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Ankermoleküle aus einer der folgenden Strukturen bestehen:
 - (i) $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_k-\text{X}-\text{SH}$,
wobei X eine Einfachbindung oder $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_l-$,
k = 2 bis 12 und l = 2 bis 4 bedeutet;
 - (ii) $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_m-[\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n]_p-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$,
wobei m, n = 2 bis 8; p = 0 bis 2 bedeuten;
 - (iii) $-(\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH})_q-\text{CO}-(\text{CH}_2)_r-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$,

wobei $q = 1$ bis 3 und $r = 2$ bis 8 bedeutet.

4. Implantat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Ankermoleküle aus einen der folgenden Strukturen ausgewählt werden:



10

5. Implantat nach einen der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide über die Carboxyl-Gruppe des Ankermoleküls durch Amid-Bindung und die Ankermoleküle über die Mercapto- oder Acrylat-Gruppe an die Implantatoberfläche gebunden sind.

15

6. Implantat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein solches Peptid-Ankermolekül an der Implantatoberfläche fixiert ist, so daß ein sterisch kritischer, absoluter Mindestabstand zwischen Zellerkennungsdomäne des Peptides und ungeschichteter Materialoberfläche von 2,5 bis 3,5 nm, vorliegt.

20

7. Implantat nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide an $\alpha_v\beta_3$ -/ $\alpha_v\beta_5$ exprimierende Zellen zu binden vermögen.

8. Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es Peptide mit der Aminosäuresequenz RGD aufweist.

25

9. Implantat nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es Peptide der Sequenz cyclo-RGDfK aufweist.

30

10. Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es zwischen den besagten Peptiden bzw. Peptid-Ankermolekülen und der Oberfläche der Trägermatrix eine haftvermittelnde Zwischenschicht und / oder verzweigte Moleküle, die einen oberflächenvergrößernden Effekt bewirken, aufweist.

5

11. Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägermatrix ein entsprechendes Formstück aus Keramik, Polymermaterial, Metall ist oder ein strukturiertes Gebilde aus diesen Materialien darstellt, daß durch in vivo oder in vitro Besiedlung mit Zellen als biohybrides Organ ausgebildet werden kann.

10

12. Verfahren zur Herstellung von Implantaten gemäß der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man

(i) die Integrin-Rezeptor-Struktur des Zielgewebes, in welches das Implantat in vivo eingebracht werden soll, mittels eines in-vitro Testsystems bestimmt,

15 (ii) die besagten Peptide mit der entsprechenden komplementären Struktur auswählt bzw. synthetisiert und,

(iii) die besagten Peptide direkt oder über die besagten Ankermoleküle an die jeweilige, gegebenenfalls modifizierte Oberfläche des Implantats kovalent bindet, wobei die lokale Anordnung unterschiedlicher Peptide auf der Oberfläche des Implantats der jeweiligen zuvor festgestellten lokalen Anordnung der Zielzellen mit dem komplementären Integrinmuster entspricht, in die das Implantat eingebracht werden soll.

20

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die in vitro-Bestimmung der Integrin-Rezeptor-Struktur des Zielgewebes mittels immunhistologisch wirksamer Antikörper erfolgt.

25

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplung der besagten Peptide bzw. der Peptid-Ankermoleküle an die Implantatoberfläche mittels für andere Beschichtungsarten bekannter Verfahren erfolgt.

30

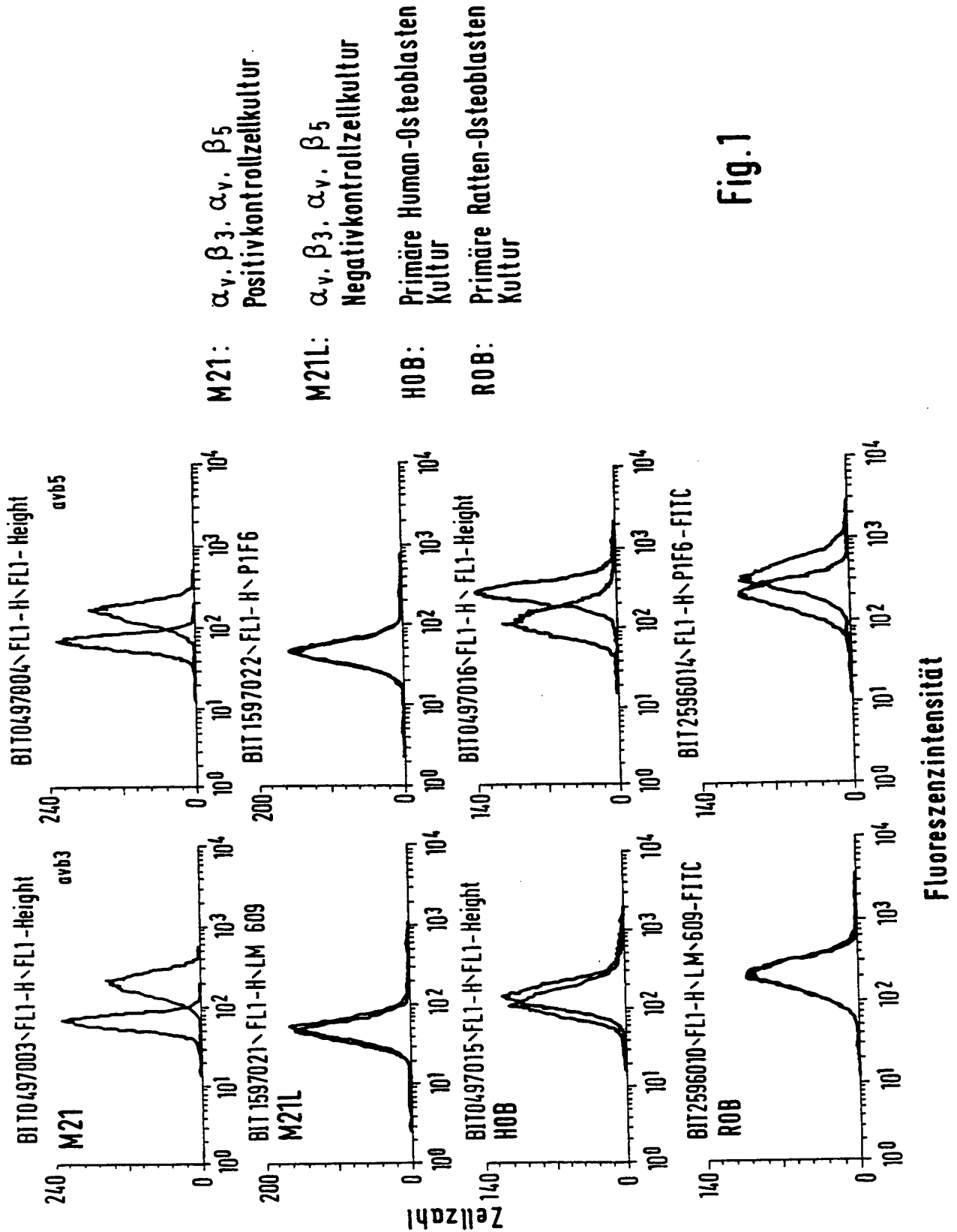
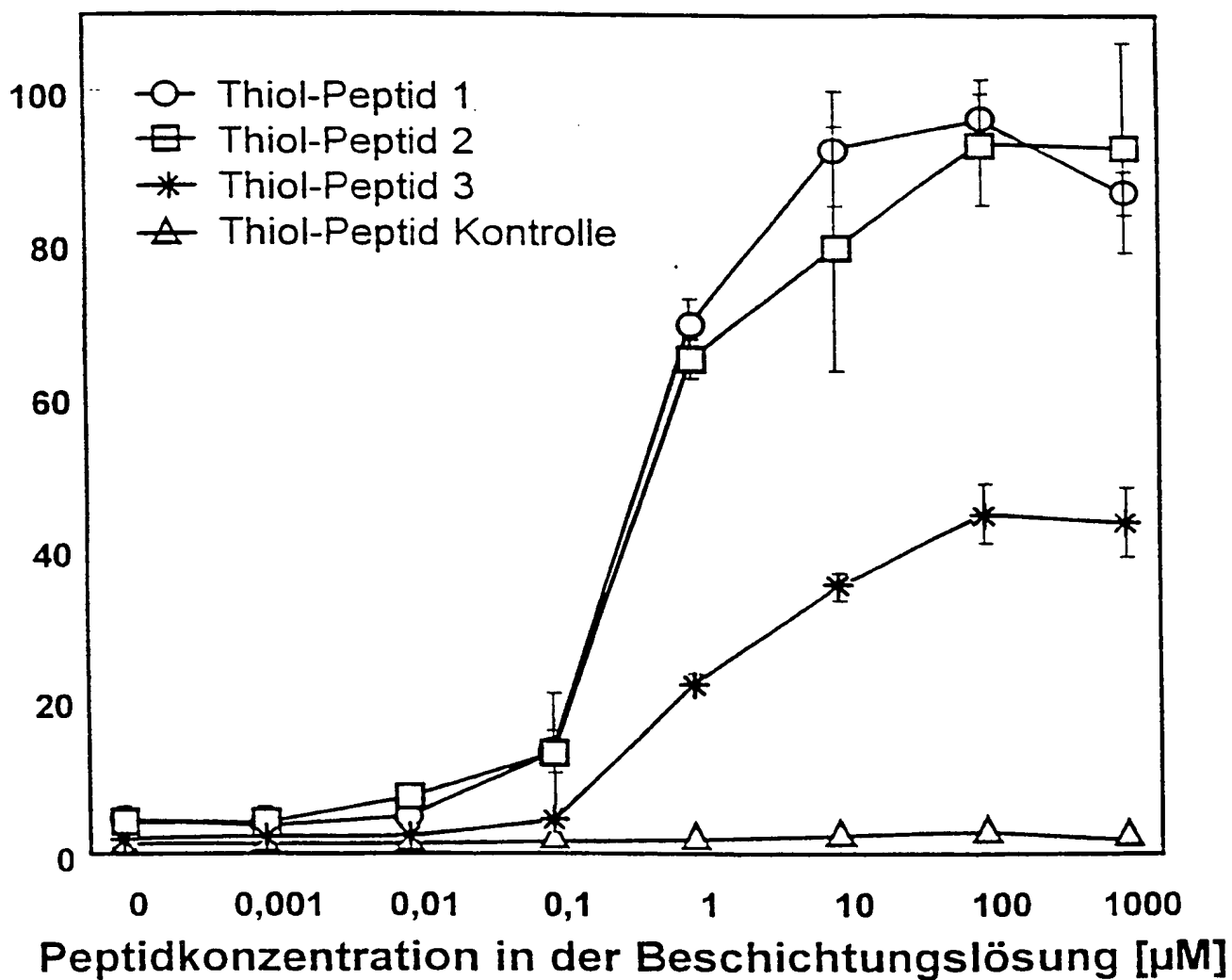


Fig.1

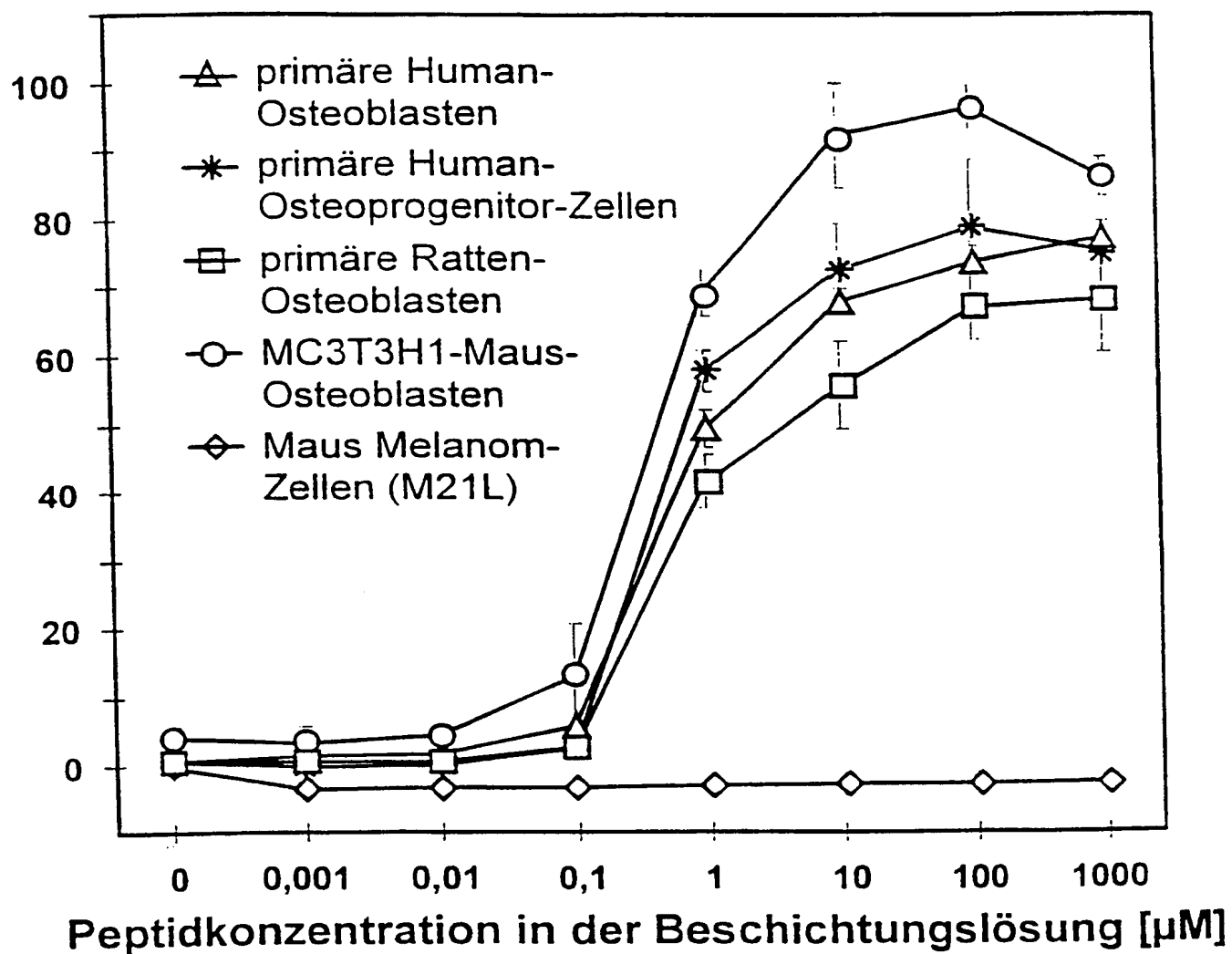
2/17

FIG. 2

Zellanhaftungsrate [%]

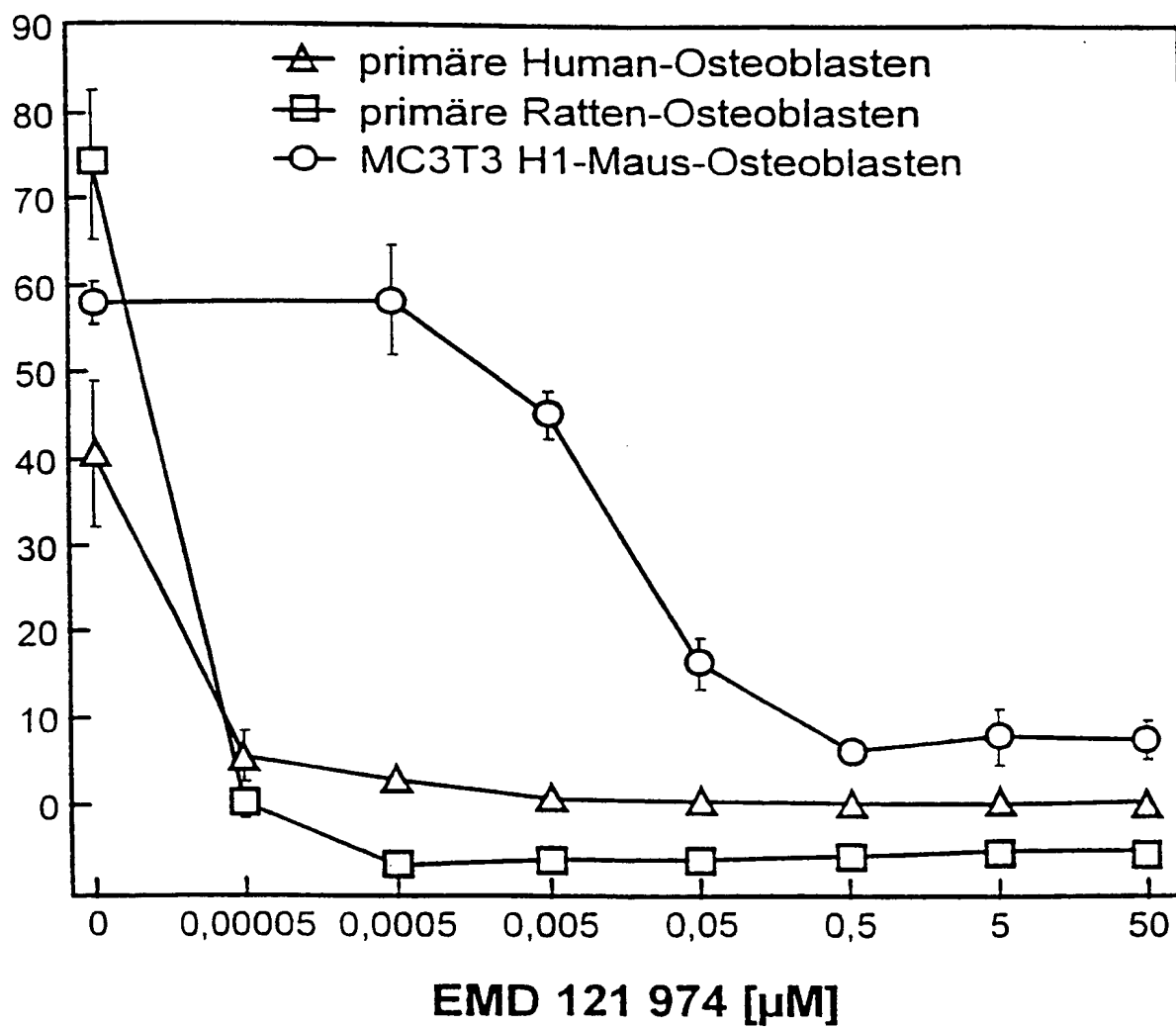
3/17

FIG. 3

Zellanhaftungsrate [%]

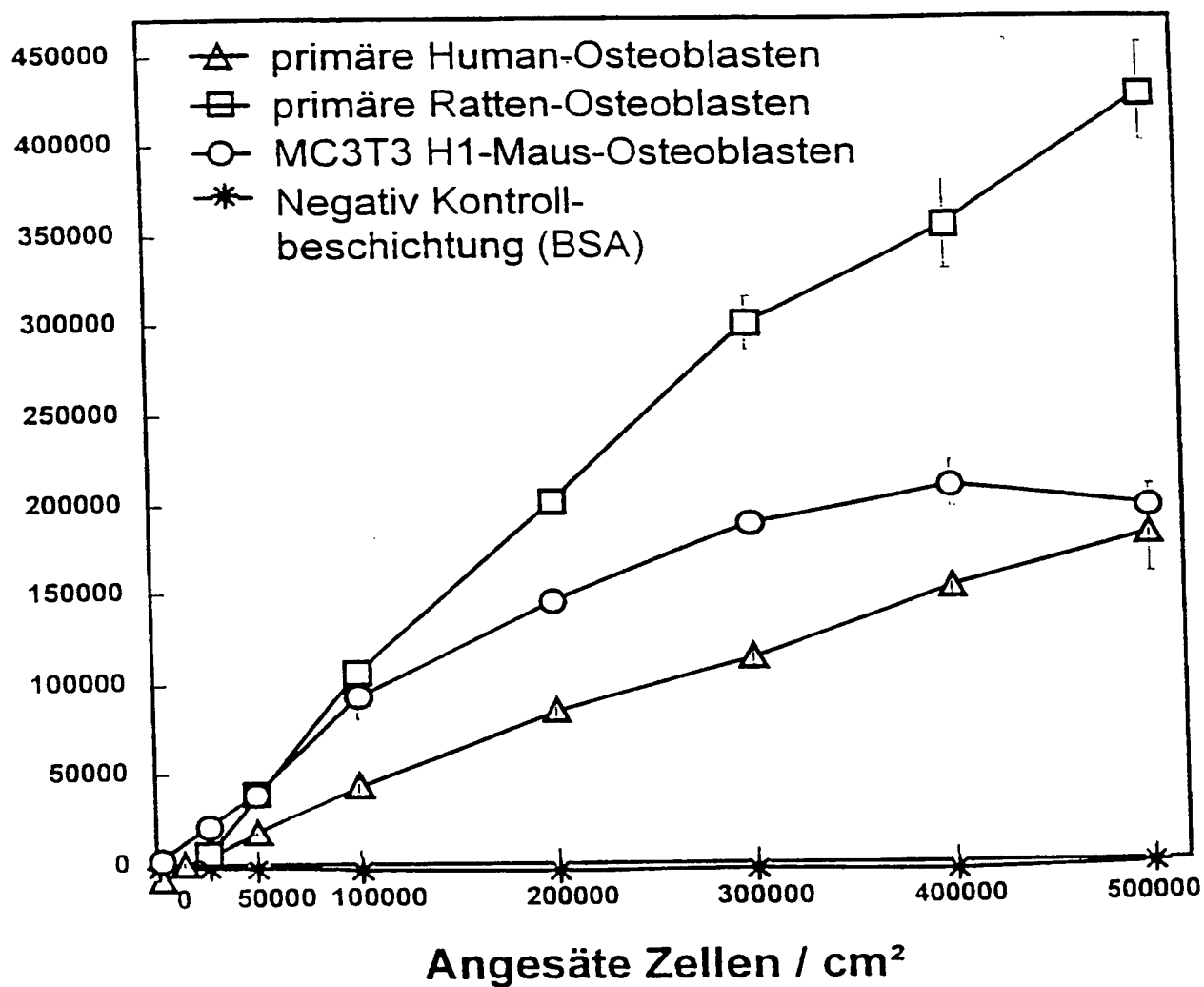
4/17

FIG. 4

Zellanhaftungsrate [%]

5/17

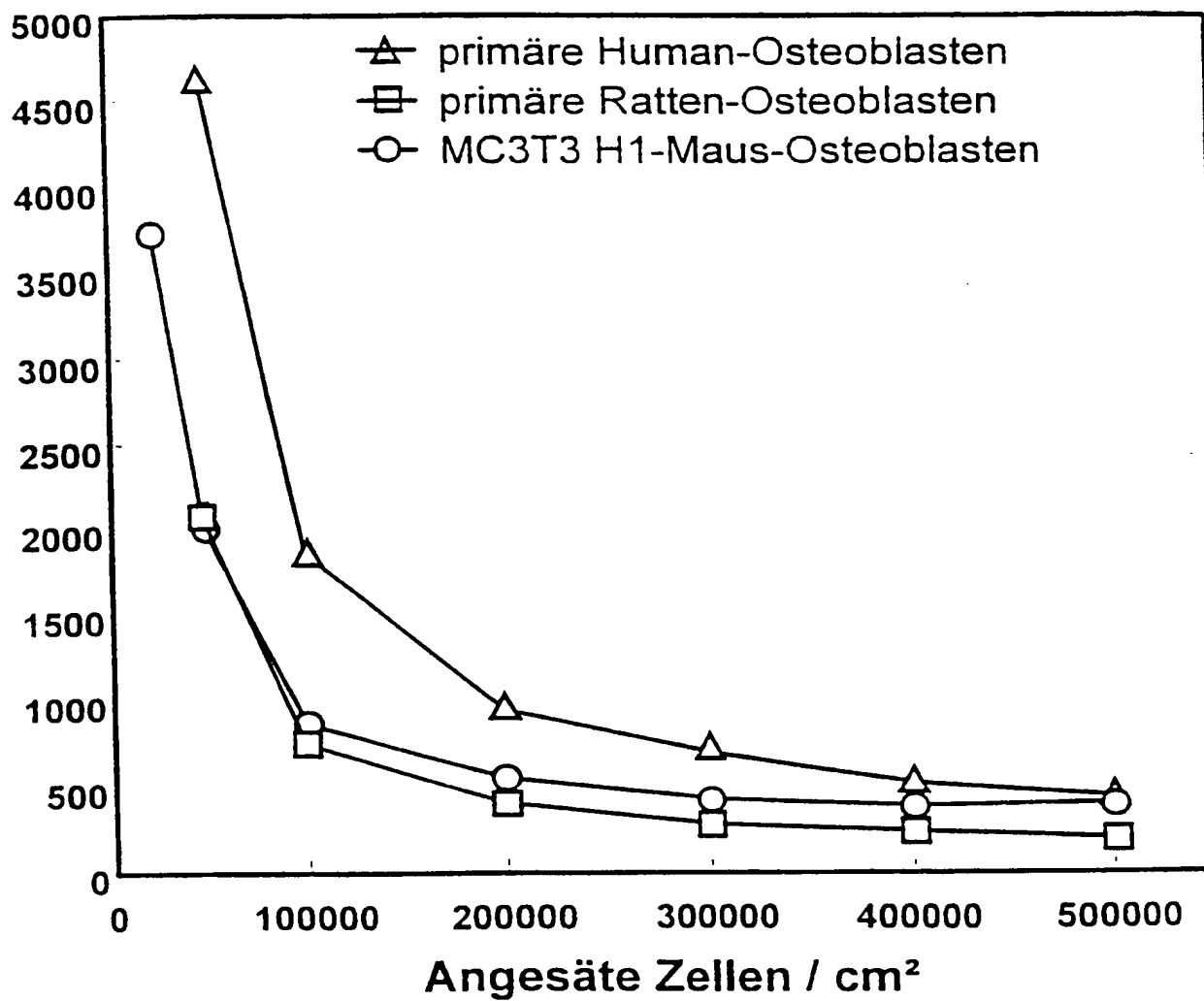
FIG. 5

Adhärerte Zellen / cm²

6/17

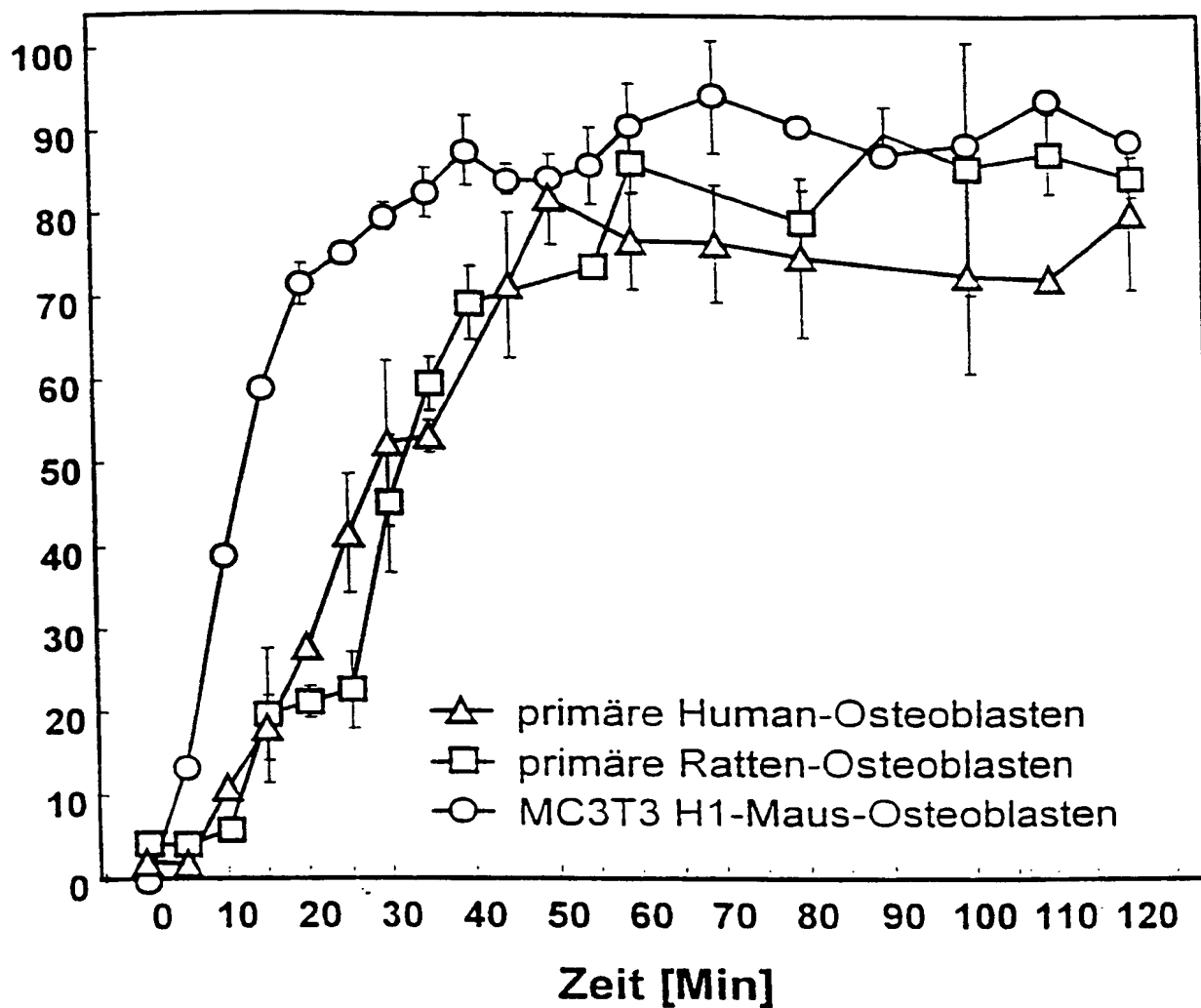
FIG. 6

kalkulierte durchschnittliche Fläche /
adhärierte Zelle [μm^2]



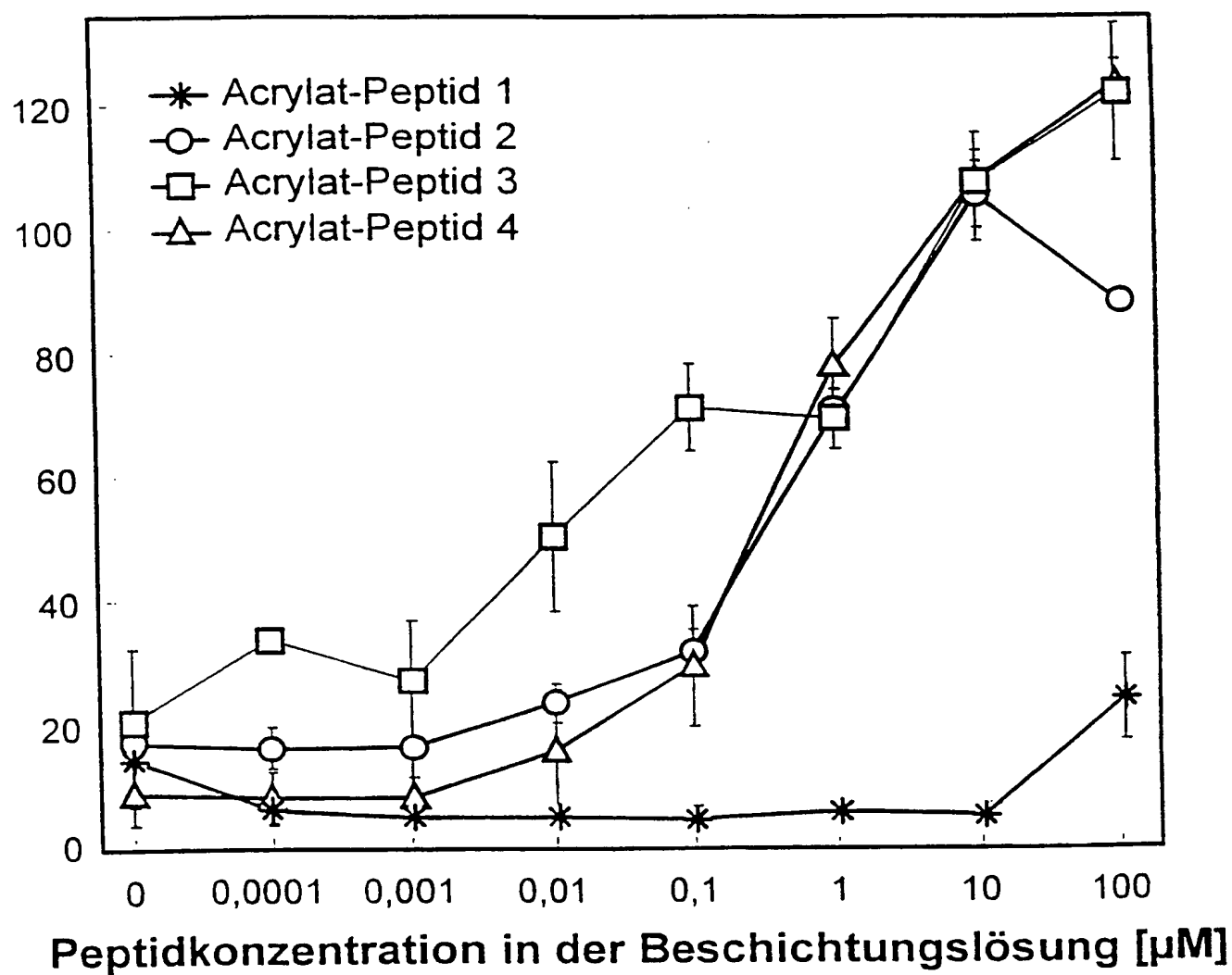
7/17

FIG. 7

Zellanhaftungsrate [%]

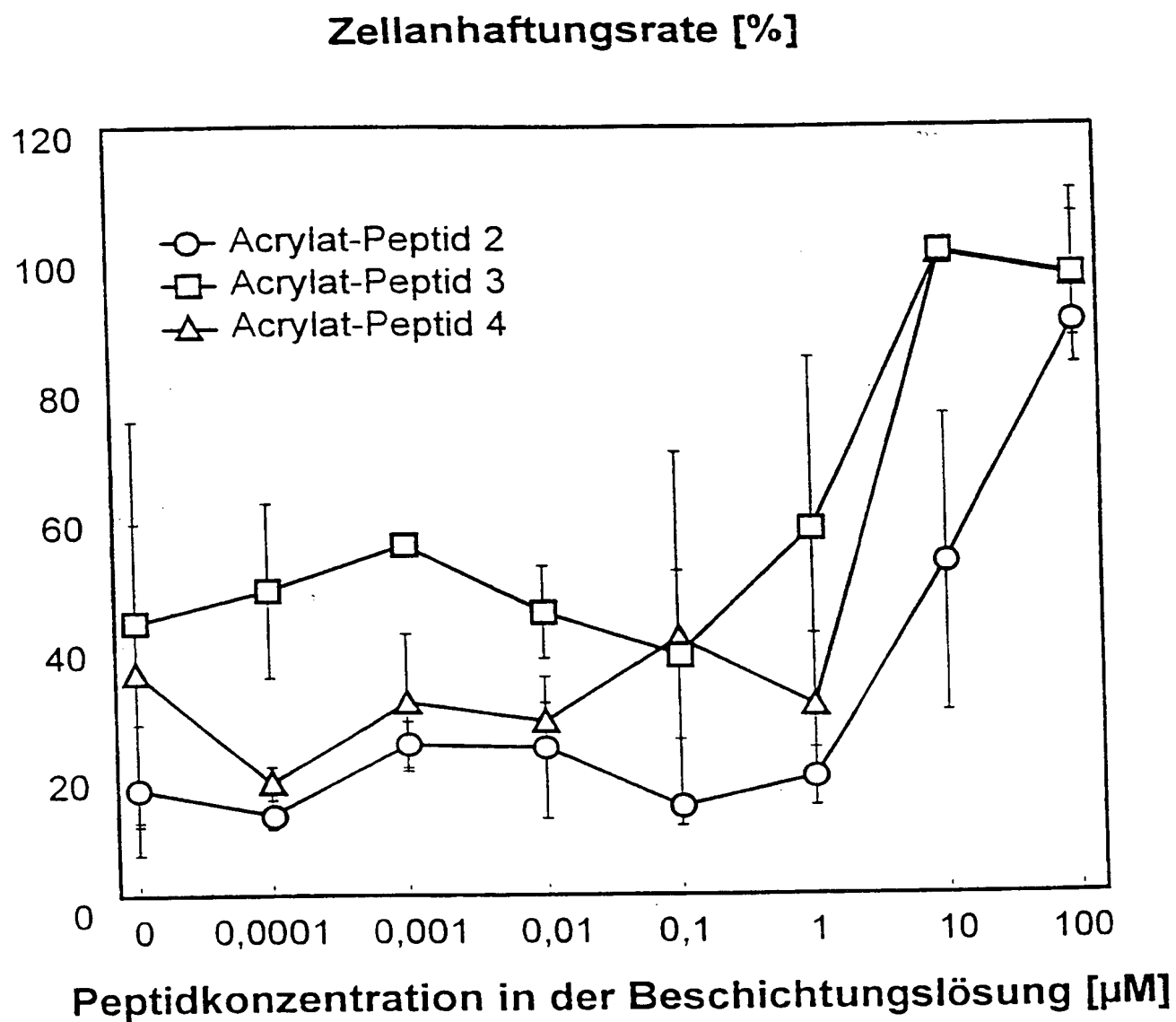
8/17

FIG. 8
Zellanhaftungsrate [%]



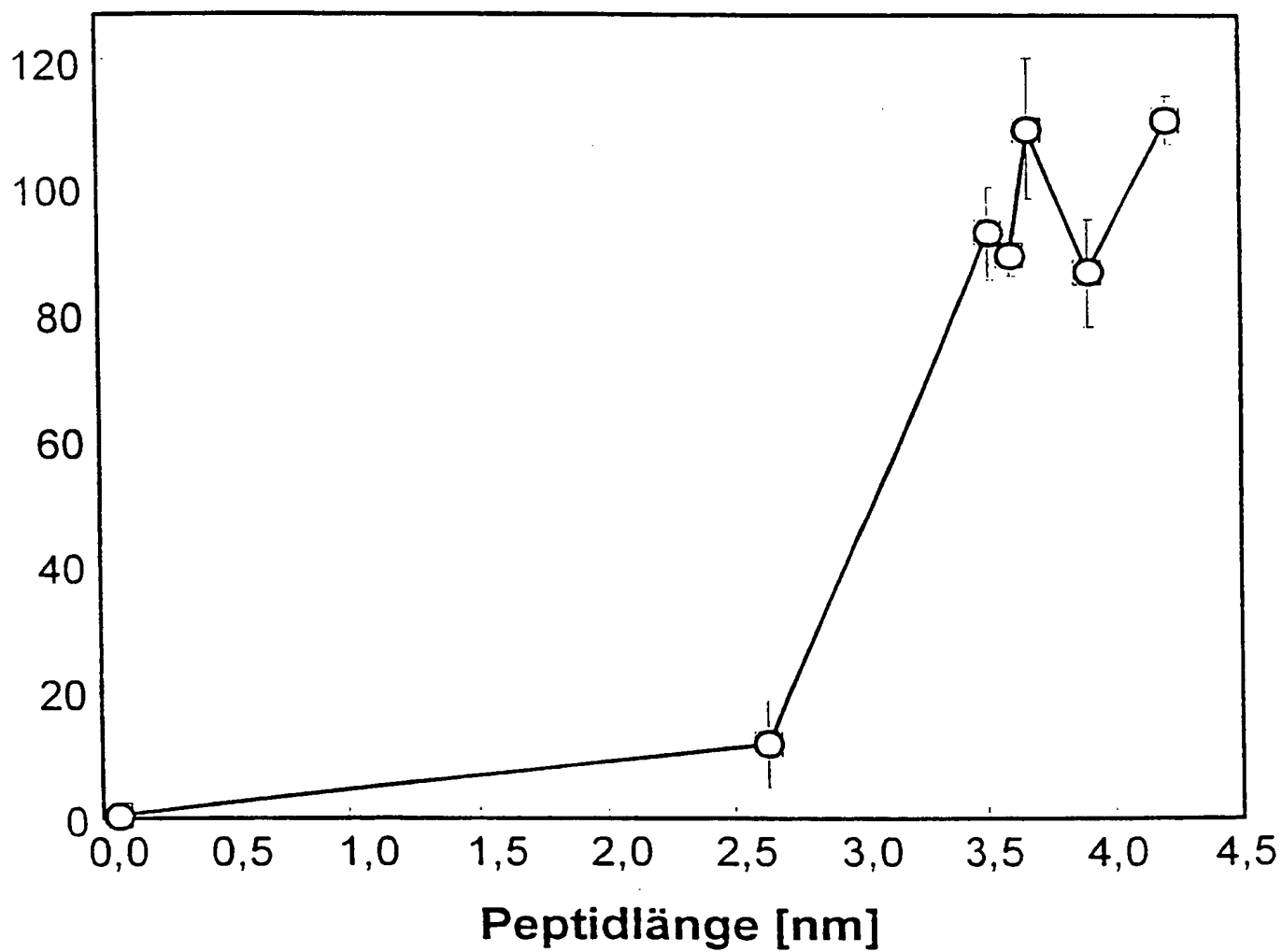
9/17

FIG. 9



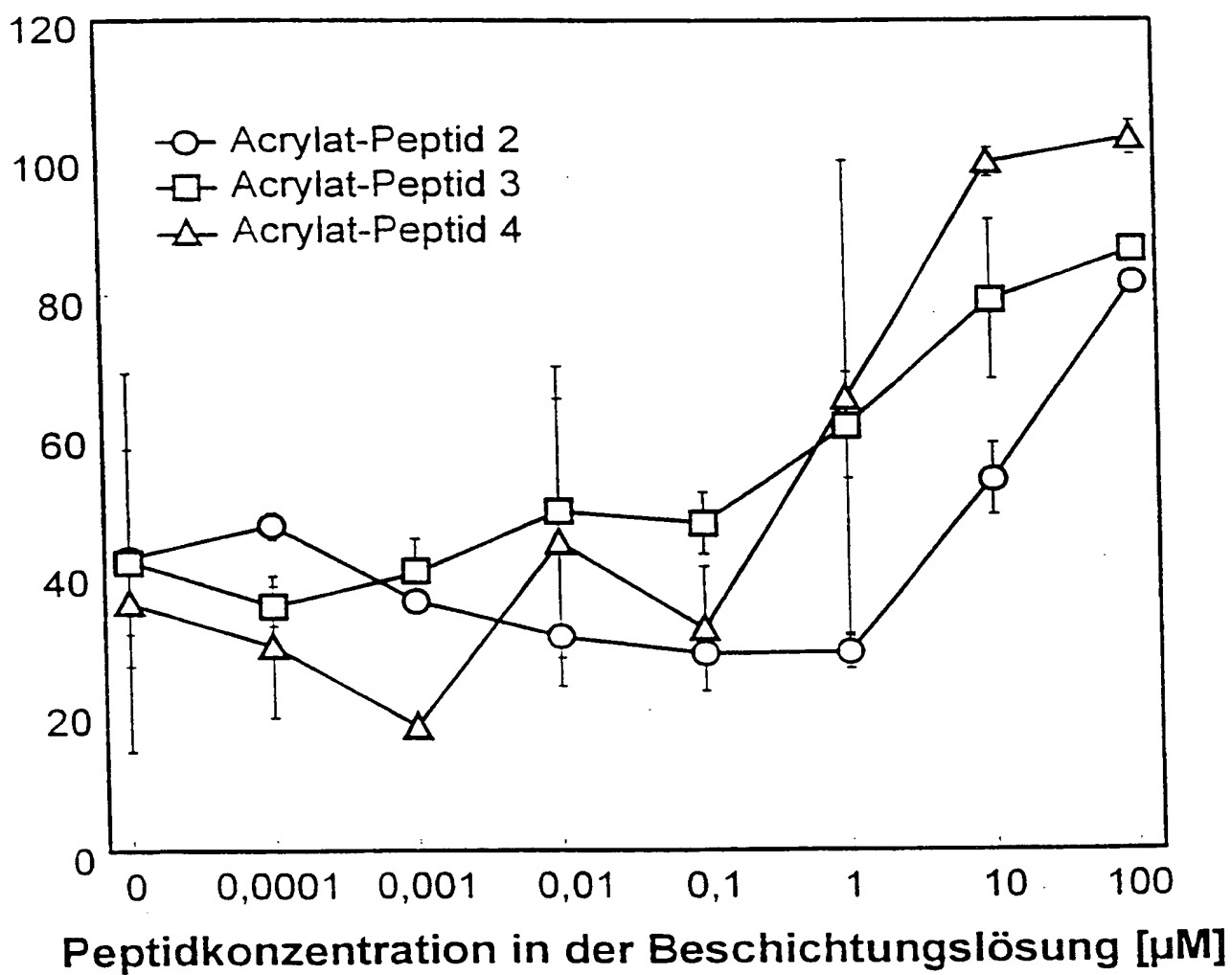
10/17

FIG. 10

Max. Zellanhaftungsrate [%]

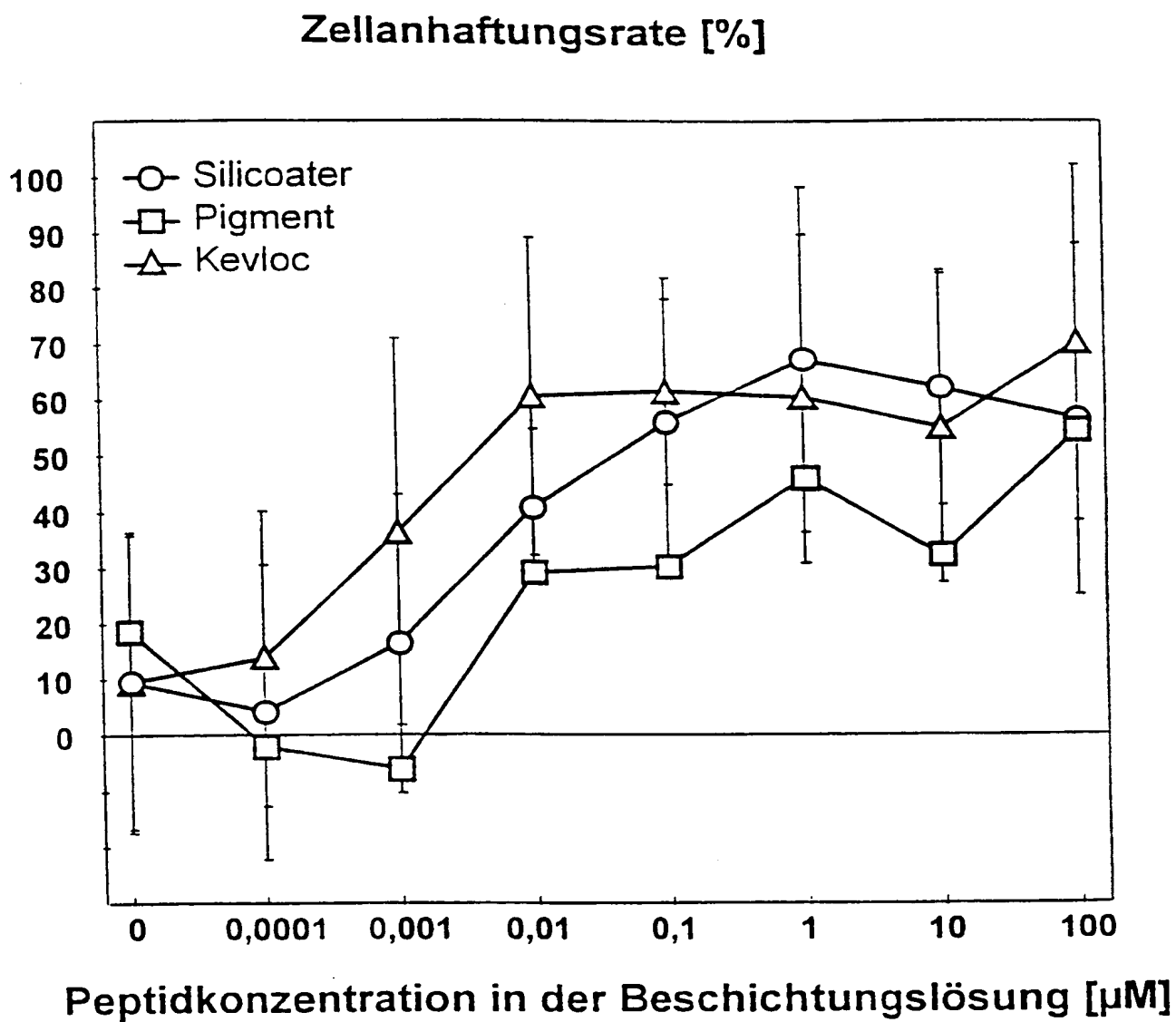
11/17

FIG. 11

Zellanhaftungsrate [%]

12/17

FIG. 12



13/17

FIG. 13

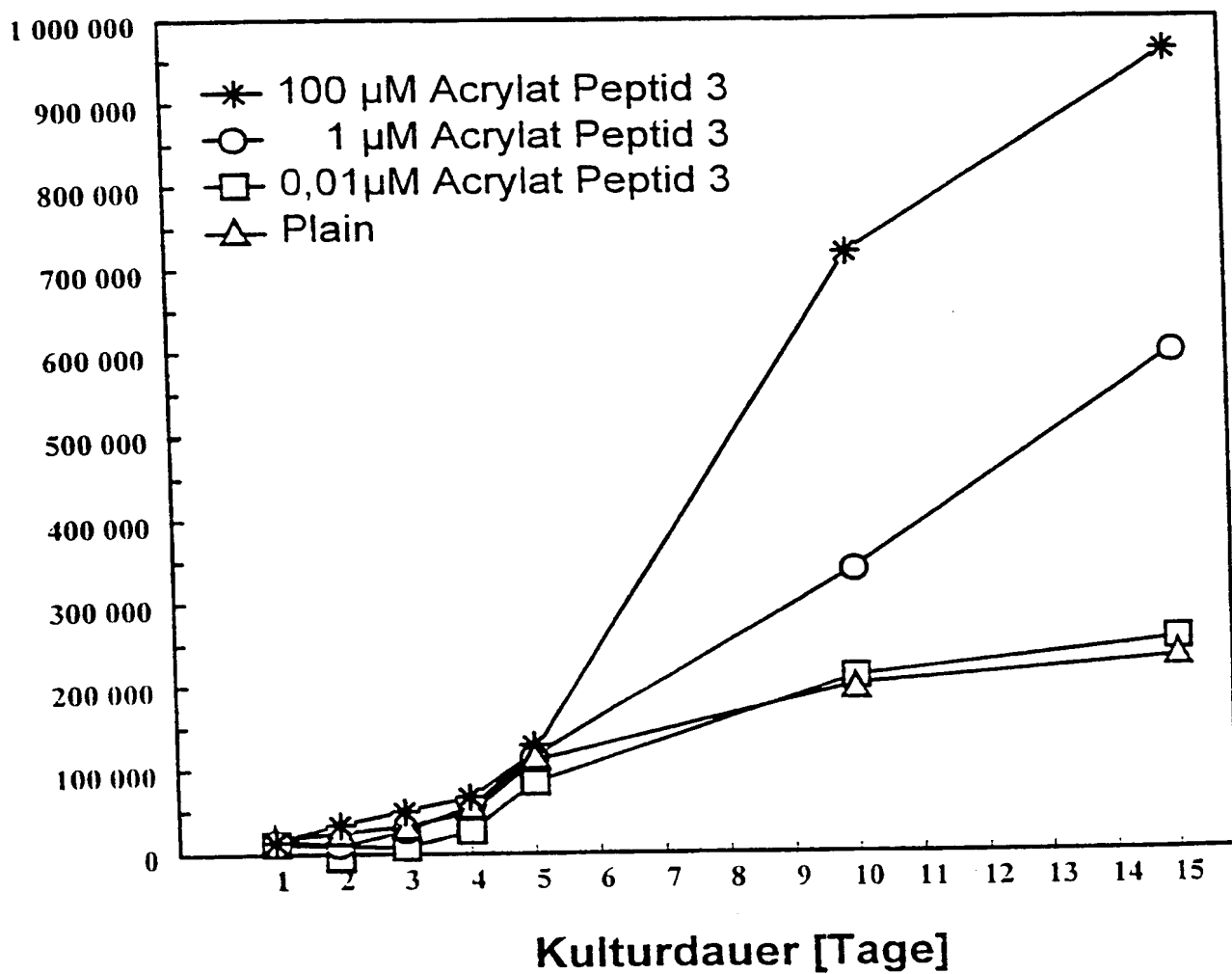
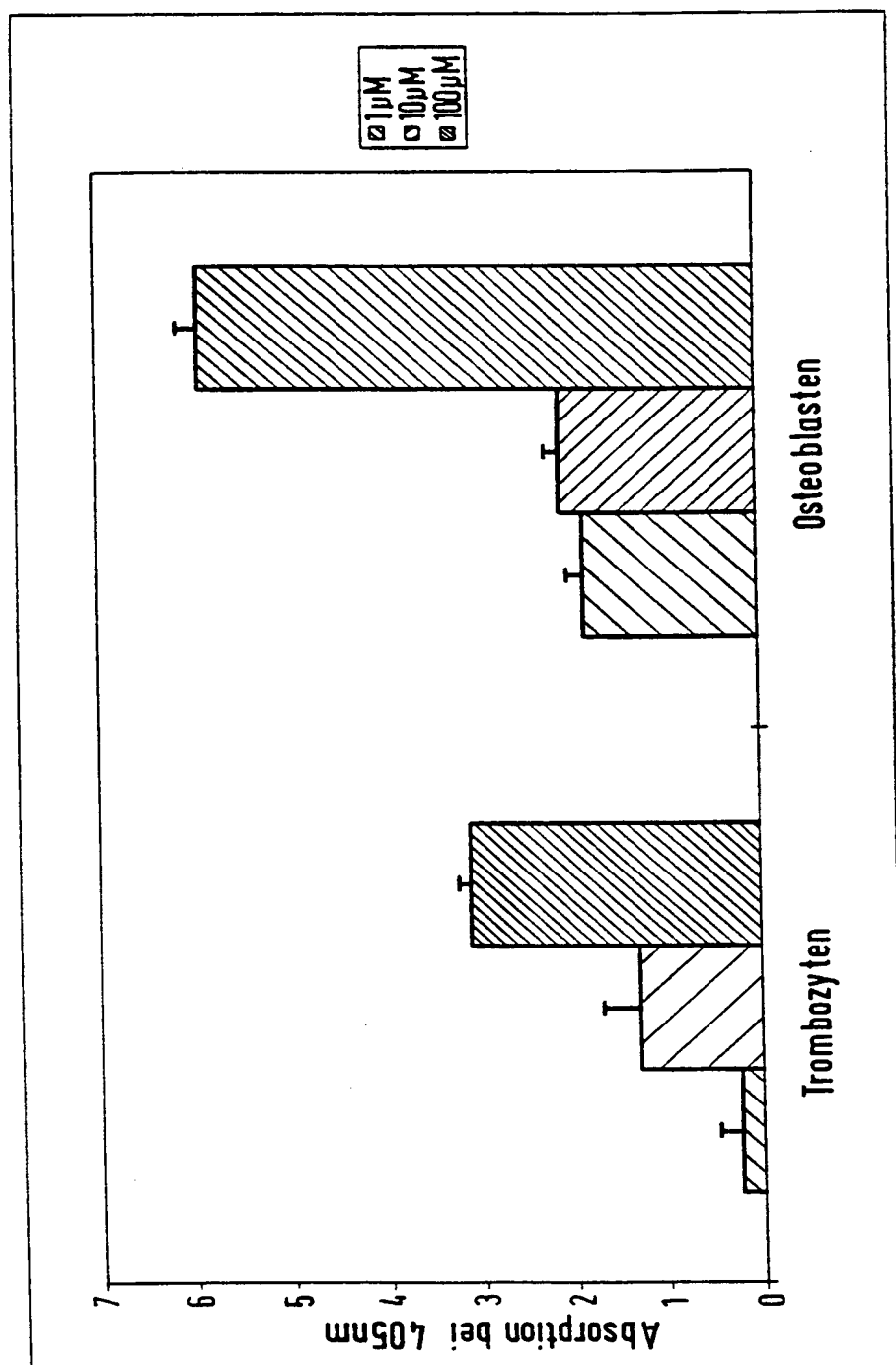
Zellzahl

Fig.14



15/17

Fig.15

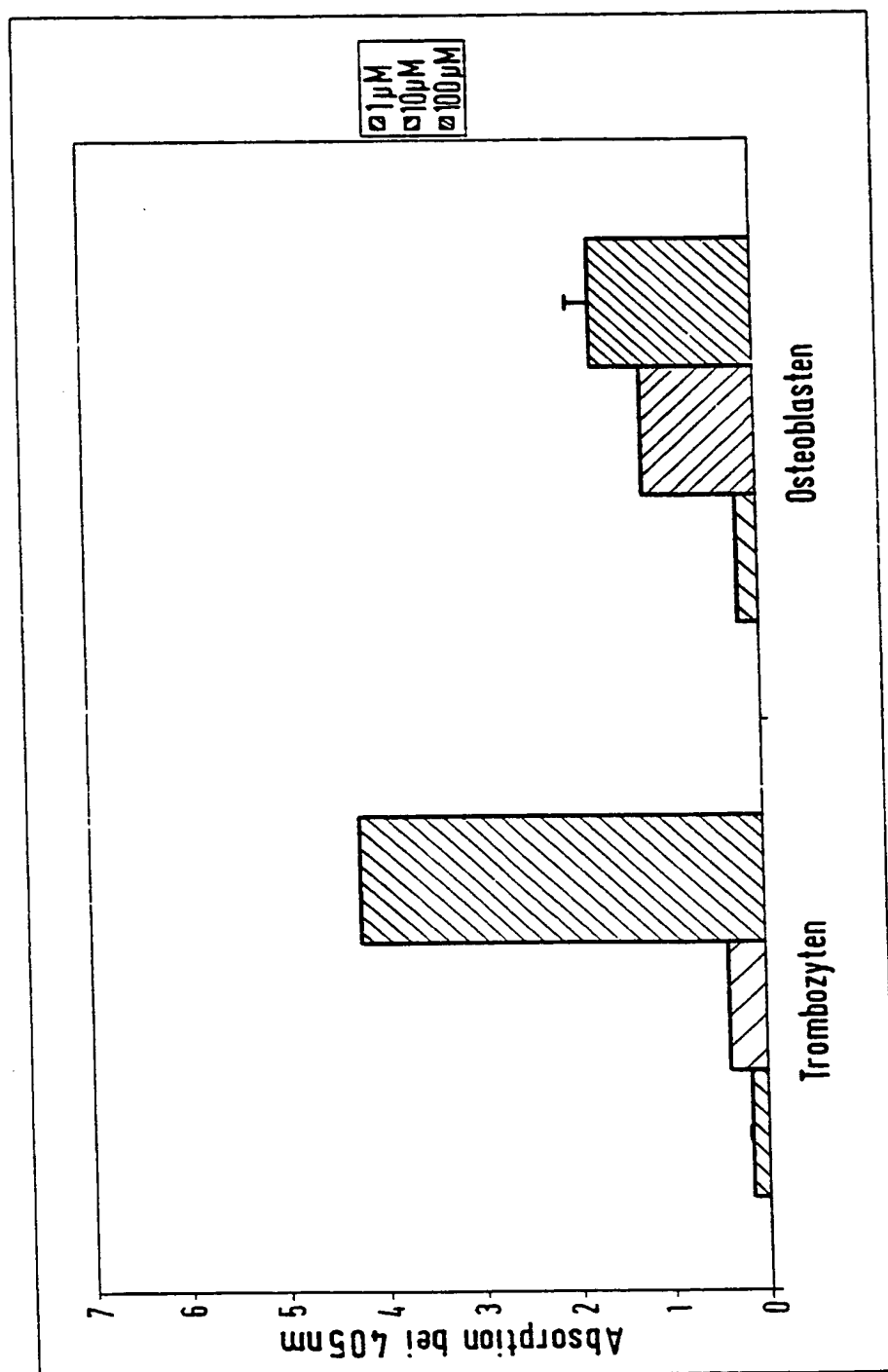


Fig.16

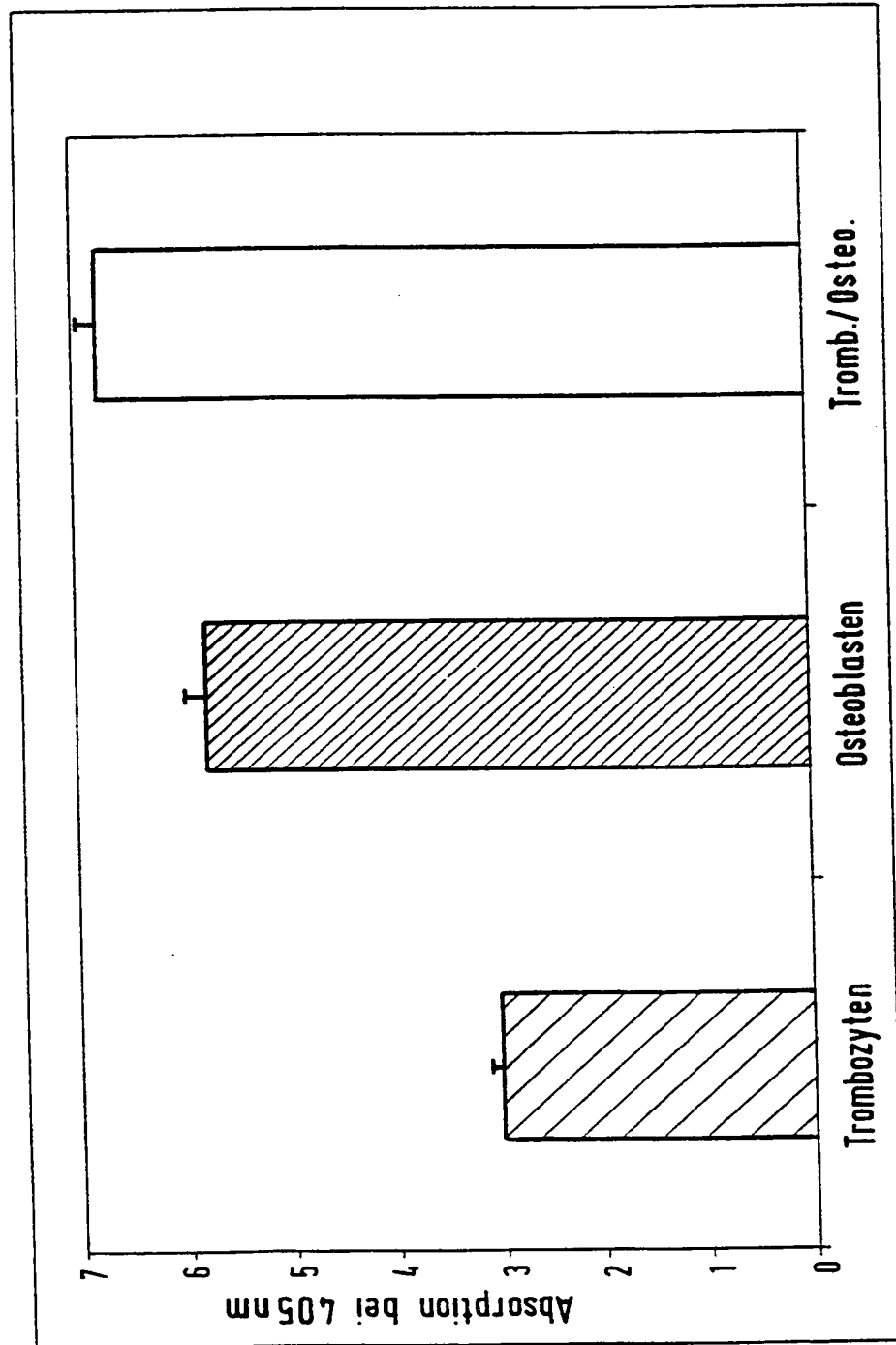
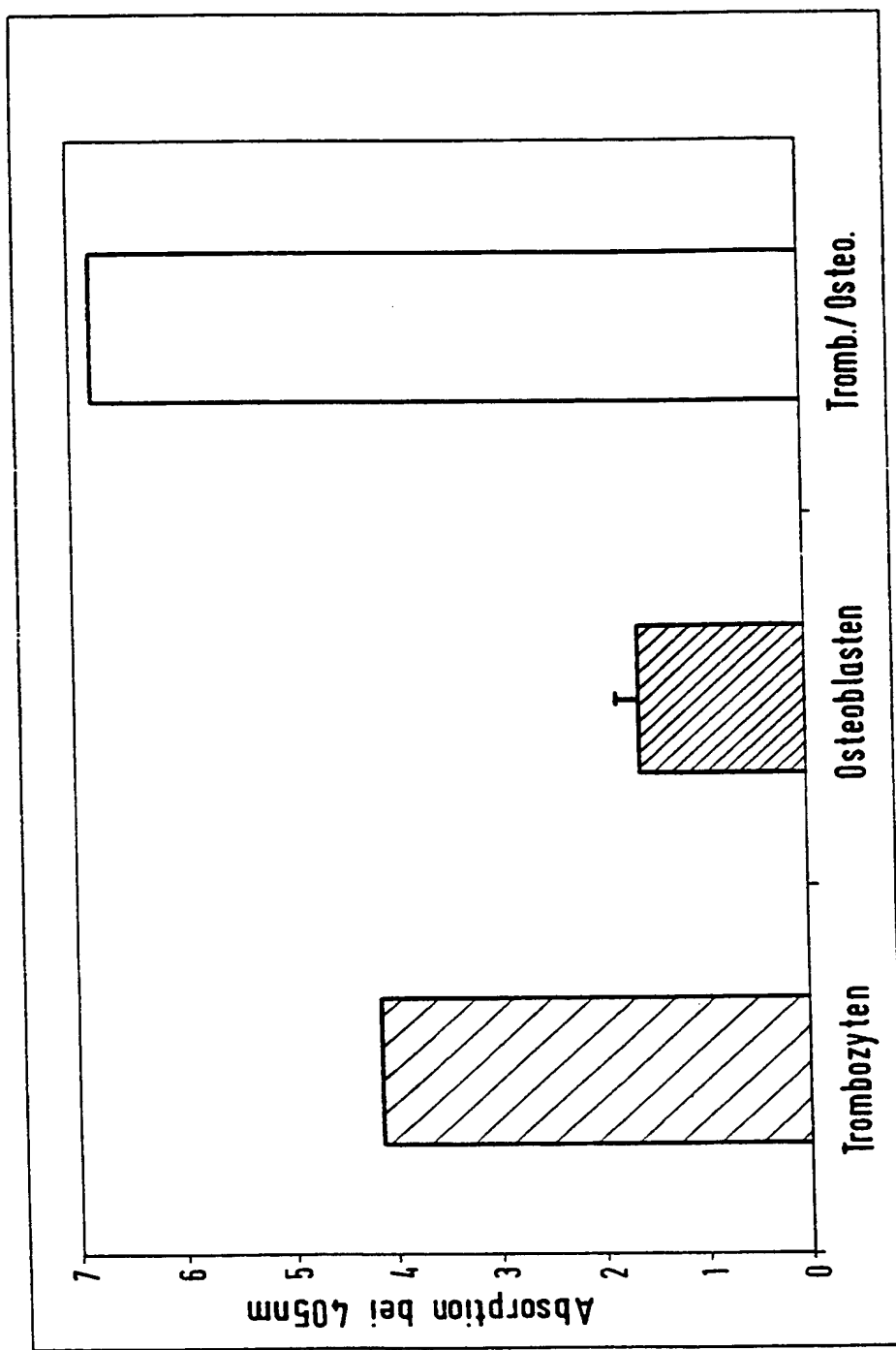


Fig. 17



PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61L 27/00, C07K 17/06		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/52619
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. November 1998 (26.11.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02753		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Mai 1998 (09.05.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 21 352.9 22. Mai 1997 (22.05.97) DE 197 55 801.1 16. Dezember 1997 (16.12.97) DE 198 18 098.5 23. April 1998 (23.04.98) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KESSLER, Horst [DE/DE]; Lichtenbergstrasse 4, D-85748 Garching (DE). FINSINGER, Dirk [DE/DE]; Lichtenbergstrasse 4, D-85748 Garching (DE). JONCZYK, Alfred [DE/DE]; Schepp-Allee 57, D-64295 Darmstadt (DE). MEYER, Jörg [DE/DE]; Schillerstrasse 82, D-63329 Egelsbach (DE). NIES, Berthold [DE/DE]; Bahnhofstrasse 27, D-64407 Fränkisch-Crumbach (DE). KANTLEHNER, Martin [DE/DE]; Plantagenweg 37, D-85354 Freising (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 18. März 1999 (18.03.99)	
(54) Title: PEPTIDE-COATED IMPLANTS AND METHODS FOR PRODUCING SAME			
(54) Bezeichnung: PEPTID-BESCHICHTETE IMPLANTATE UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG			
(57) Abstract			
The invention relates to the possibility of biofunctionalizing biomaterials, in particular implants, by covering them with a tailor-made coating of synthesised cell- or tissue-selective RGD peptides which primarily stimulate in vitro the adhesion of cell types intended to ensure the tissue integration of the biomaterial in question.			
(57) Zusammenfassung			
Die Erfindung beschreibt die Möglichkeit der Biofunktionalisierung von Biomaterialien, insbesondere Implantaten, durch deren maßgeschneiderte Beschichtung mit synthetisierten zell- bzw. gewebe selektiven RGD-Peptiden, die in vitro die Adhäsion vorwiegend derjenigen Zell-Spezies stimulieren, die jeweils die Gewebeintegration des entsprechenden Biomaterials vollführen sollen.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 98/02753

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61L27/00 C07K17/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61L C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 92 00047 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 9 January 1992 see claims 1-3,42-44	1,2,7,8, 11-14
A	HIRANO Y ET AL.: "Synthesis and cell attachment activity of bioactive oligopeptides: RGD, RGDS, RGDV, and RGDV" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, vol. 25, no. 12, December 1991, pages 1523-1534, XP002090255 cited in the application see page 1528, paragraph 4 - page 1529, paragraph 1	1,2,7,8, 11-14

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 January 1999

Date of mailing of the international search report

01/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heck, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/02753

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9200047 A	09-01-1992	AU 8286491 A	23-01-1992

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02753

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61L27/00 C07K17/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61L C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 92 00047 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 9. Januar 1992 siehe Ansprüche 1-3,42-44 -----	1,2,7,8, 11-14
A	HIRANO Y ET AL.: "Synthesis and cell attachment activity of bioactive oligopeptides: RGD, RGDS, RGDV, and RGDV" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, Bd. 25, Nr. 12, Dezember 1991, Seiten 1523-1534, XP002090255 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 1528, Absatz 4 - Seite 1529, Absatz 1 -----	1,2,7,8, 11-14



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Januar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

01/02/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Heck, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02753

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9200047 A	09-01-1992	AU 8286491 A	23-01-1992